

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**INTERACCIONES MOLECULARES EN LA
TRANSFERENCIA
CONJUGATIVA DEL PLÁSMIDO pMV158**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Fabián Lorenzo Díaz

Bajo la dirección del doctor:

Manuel Espinosa Padrón

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-3486-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**INTERACCIONES MOLECULARES EN LA TRANSFERENCIA
CONJUGATIVA DEL PLÁSMIDO pMV158**

Memoria presentada por Fabián Lorenzo Díaz para optar al grado de Doctor en
Biología por la Universidad Complutense de Madrid

Madrid, Noviembre 2009

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Luis Fabián Lorenzo Díaz bajo la dirección del Profesor Manuel Espinosa Padrón, en el Departamento de Ciencia de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), con la financiación concedida por el Ministerio de Sanidad y Consumo a través del Instituto de Salud Carlos III (Beca BEFI 03/00529) y por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas a través del Proyecto Intramural Especial (PIE) 200420E410.

Opta al grado de Doctor

VºBº del director de la Tesis

Fabián Lorenzo Díaz

Dr. Manuel Espinosa Padrón

A mi familia

Agradecimientos

Gracias a mi familia. A mi madre por estar siempre ahí, cuidando de mí. Por enseñarme a ser quien soy y a tener “fundamento”. A mi hermano por ser mi mejor amigo y por todo su apoyo. A Noemi, por todo lo que hemos compartido estos años, por motivarme continuamente, sobre todo en momentos difíciles.

A toda la gente del Hospital Universitario Ntra. Sra. de La Candelaria (Tenerife). A Chano por abrirme las puertas del mundo de la investigación, y a Jesús Villar por recibirme en su grupo. A Félix, por mi primer artículo, además de por su apoyo para dar el salto y, como en su día me decía Manolo, arriesgarme a la “aventura peninsular”. A Carlos, por estar siempre ahí.

A mi segunda familia, el CIB. Gracias a Manolo, por recibirme en su laboratorio, por ser un gran director de tesis y por recordarme continuamente que hay que disfrutar de lo que hacemos. A “mis chicas del lab”: a Alicia, por todo lo que he aprendido de ella y por su ayuda; a Gloria, por tener siempre tiempo para ayudarme; a Maite y a Lorena, por todo su trabajo; a Concha, por su entusiasmo; a Celeste, Ana, Virtu, Inma, Sofi, Wai Ting, Tania, Marta y Cristi, por todo su apoyo. Al “compañero” Jose, por su ayuda constante. A los vecinos del 306 (el grupo de Paloma López).

A toda la gente con la que hemos colaborado. A Miquel Coll y a todo su grupo del Instituto de Biología Estructural de Barcelona (CSIC), en especial a Silvia y Rosa, por su dedicación y empeño. Al grupo del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (Argentina), en especial a Cecilia, Silvia y Diego. A Rudi Lurz, del Max-Planck Institut für molekulare Genetik de Berlin (Alemania) por dedicarnos su tiempo. Al grupo de Joel Schildbach de la John Hopkins University (Baltimore, USA), por recibirme en su laboratorio y a Lubos, por toda su ayuda. A Margarita Menéndez, y todo su grupo del Instituto de Química-Física “Rocasolano” (CSIC, Madrid), por su paciencia y dedicación.

Sin duda, ha sido una de las mejores decisiones que he tomado en mi vida.

No solo porque me ha permitido aprender más cosas de las que podía imaginar, sino porque me ha ayudado a crecer como persona.

Fabián

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
1. PLÁSMIDOS BACTERIANOS.....	1
1.1. Clasificación.....	1
1.2. Mecanismos de replicación y control.....	2
1.3. Rango de huésped.....	4
2. TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL.....	5
2.1. Modelo de transferencia de DNA por conjugación.....	7
2.2. Bases moleculares de la conjugación.....	8
2.3. Orígenes de transferencia y relaxasas.....	18
2.3.1. Familia MOB _F	20
2.3.2. Familia MOB _H	23
2.3.3. Familia MOB _C	23
2.3.4. Familia MOB _Q	23
2.3.5. Familia MOB _P	24
2.3.6. Familia MOB _Y	26
3. EL PLÁSMIDO pMV158.....	27
3.1. El módulo LIC.....	28
3.2. El módulo DET.....	30
3.3. El módulo MOB.....	31
3.4. Orígenes de cadena retrasada (sso).....	34
OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
MATERIALES.....	43
1. ESTIRPES BACTERIANAS.....	43
2. MEDIOS DE CULTIVO Y SELECCIÓN.....	43
3. ÁCIDOS NUCLEICOS.....	45
3.1. Plásmidos.....	45
3.2. Oligonucleótidos.....	46
4. ENZIMAS, PRODUCTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS.....	47
5. TAMPONES.....	49
6. SOPORTE INFORMÁTICO.....	51
MÉTODOS.....	53
1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.....	53
2. CLONACIÓN DE DNA.....	53
2.1. Preparación de células competentes.....	53
2.2. Preparaciones de DNA.....	54

2.2.1. Extractos crudos celulares.....	54
2.2.2. Extracción de DNA plasmídico	54
2.3. Obtención de fragmentos de DNA.....	54
2.3.1. Digestión con enzimas de restricción	54
2.3.2. Amplificación en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	55
2.4. Purificación	55
2.4.1. DNA bicatenario.....	55
2.4.2. Oligonucleótidos	55
2.5. Ligación de DNA.....	56
2.6. Transformación.....	56
2.6.1. Transformación natural	56
2.6.2. Transformación mediante electroporación.....	56
2.7. Construcción de plásmidos recombinantes	57
2.7.1. Vectores de expresión de mutantes de la proteína MobM	57
2.7.2. Mutantes en los orígenes de cadena retrasada (sso) de pMV158	58
3. ANÁLISIS DE DNA	58
3.1. Cuantificación	58
3.2. Electroforesis.....	58
3.2.1. Geles de Agarosa	58
3.2.2. Geles de Poliacrilamida	59
3.2.2.1. Geles PAA nativos	59
3.2.2.2. Geles PAA desnaturalizantes.....	59
3.3. Secuenciación	60
3.3.1. Secuenciación Manual.....	60
3.3.2. Secuenciación Automática.....	60
4. MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA	60
4.1. Marcaje en el extremo 5'	60
4.2. Marcaje interno.....	61
5. MANIPULACIÓN DE RNA	61
5.1. Transcripción <i>in vitro</i>	61
5.2. Retrotranscripción	62
6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	62
6.1. MobM y derivados	63
6.2. MobMN199His.....	64
6.3. Purificación de MobMN199 con Selenio-Metionina.....	65
7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	65
7.1. Cuantificación	65
7.2. Electroforesis desnaturalizante en geles de PAA.....	65

7.3. Secuenciación del extremo NH ₂	66
7.4. Ultracentrifugación analítica	66
7.4.1. Velocidad de Sedimentación	66
7.4.2. Equilibrio de Sedimentación	67
7.5. Medida de masas moleculares por MALDI-TOF	67
7.6. Predicción de estructura secundaria de proteínas	67
7.7. Análisis de dicroísmo circular	68
7.7.1. Determinación espectroscópica	68
7.7.2. Análisis de la estabilidad térmica	68
7.8. Calorimetría isotérmica de valoración (ITC)	69
8. INTERACCIONES DNA-PROTEÍNA	69
8.1. Visualización de complejos nucleoproteicos por microscopía electrónica	69
8.1.1. Complejos entre MobM y pMV158.....	69
8.1.2. Complejos entre RNA polimerasa y el promotor del gen <i>mobM</i>	70
8.2. Análisis de la actividad de corte y cierre de MobM	70
8.2.1. DNA superenrollado.....	70
8.2.2. DNA monocatenario.....	71
8.3. Cálculos estequiométricos.....	71
8.4. Análisis y medidas de afinidad	71
8.5. Ensayos de competición.....	72
8.5.1. Movilidad diferencial en geles nativos (EMSA).....	72
8.5.2. Cinética de disociación	72
8.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	73
8.7. <i>Footprinting</i> sobre DNA superenrollado	73
8.8. Técnicas de cristalización.....	74
9. ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA PLASMÍDICA	75
9.1. Ensayo convencional de conjugación en filtro.....	75
9.2. Ensayos de conjugación en placas multipocillo	75
10. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS PLASMÍDICAS Y ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE ssDNA	77
RESULTADOS	79
CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>mobM</i>.....	81
1.1. Análisis de la interacción entre el promotor de <i>mobM</i> y la RNAP	84
1.2. Transcripción <i>in vitro</i> con la RNAP de <i>E. coli</i>	87
1.3. Determinación de la transcripción <i>in vivo</i> del gen <i>mobM</i>	88
CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DEL DOMINIO RELAXASA DE LA PROTEÍNA MobM	91
2.1. Purificación del dominio relaxasa de la proteína MobM	93

2.2. Estado de oligomerización de la proteína MobMN199	97
2.3. Análisis de la actividad relaxasa de MobMN199	98
2.4. Determinación de la estructura secundaria de MobMN199	100
2.5. Medidas de estabilidad térmica de MobMN199	101
2.6. Actividad de MobMN199 de tras la desnaturalización térmica	102
2.7. Efecto de los iones Mn ²⁺ en la desnaturalización de MobMN199	104
CAPÍTULO 3: INTERACCIONES ENTRE MobM Y EL ORIGEN DE TRANSFERENCIA DE pMV158	107
3.1. El origen de transferencia de pMV158 tiene tres IRs	109
3.2. Reconocimiento de diferentes sustratos de DNA por MobM.....	112
3.3. Interacciones entre MobM y DNA superenrollado de pMV158	116
3.4. Estequiometría de unión entre MobMN199 y el <i>oriT</i>	123
3.5. Afinidad de MobMN199 por oligonucleótidos	124
3.6. Definición <i>in vitro</i> del <i>oriT</i> mínimo en estado monocatenario.....	125
3.7. Estabilidad térmica de MobMN199 unida a DNA	128
3.8. Estructura tridimensional de MobMN199 unida a DNA	129
3.9. Papel del residuo Y44 de MobM en el corte de DNA	132
3.10. Actividad de corte de MobMN199 sobre DNA monocatenario	133
CAPÍTULO 4: PAPEL DE LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN DE CADENA RETRASADA EN LA TRANSFERENCIA DE pMV158	137
4.1. Construcción de plásmidos deficientes en la actividad de los orígenes de cadena retrasada.....	139
4.2. Protocolo de conjugación en filtro con placas multipocillo	141
4.3. Análisis de la eficiencia de transferencia en los mutantes <i>sso</i>	145
4.4. Medidas en la acumulación de ssDNA en la célula receptora	146
DISCUSIÓN.....	149
¿Es MobM un regulador transcripcional?	151
El dominio relaxasa de MobM se conserva en los plásmidos transferibles de la familia de replicación de pMV158	153
Propiedades y requerimientos estructurales del dominio relaxasa de la proteína MobM	155
¿Cuál es el residuo catalítico en las relaxasas de la familia MOB _V ?	159
Las interacciones de la proteína MobM con el <i>oriT</i> dependen de la secuencia y topología del DNA	161
La funcionalidad total del <i>sso</i> es esencial en el proceso conjugativo	167
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA.....	175
PUBLICACIONES.....	189

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Plásmidos conjugativos modelo de bacterias Gram-negativas.	10
Tabla 2. Estirpes bacterianas empleadas en este trabajo.	43
Tabla 3. Composición del medio mínimo enriquecido (MME).	44
Tabla 4. Listado de los plásmidos utilizados en este trabajo.	45
Tabla 5. Oligonucleótidos	46
Tabla 6. Tampones.	49
Tabla 7. Soporte informático.	51
Tabla 8. Purificación de MobMN199 y medidas de actividad específica.	96
Tabla 9. Contenido en estructura secundaria de la proteína MobMN199.	101
Tabla 10. Transferencia intra- e inter-específica de pMV158 y pMV158GFP.	143
Tabla 11. Número de copias plasmídico, ratios moleculares ss/ds DNA y coeficiente de acumulación (AC).	147
Tabla 12. Plásmidos movilizables de la familia de replicación de pMV158.	153
Tabla 13. Actividad de MobM y sus derivados	156

FIGURAS

Figura 1. Modelo de replicación por círculo rodante del plásmido pT181.	4
Figura 2. Transferencia de DNA entre células bacterianas.	6
Figura 3. Circuito regulador de los genes de transferencia de plásmidos tipo F.	9
Figura 4. Ensamblaje de proteínas del relaxosoma de los plásmidos F y R388.	11
Figura 5. Mecanismo catalítico de TrwC en el inicio de la transferencia.	12
Figura 6. Características estructurales de TrwB.	14
Figura 7. El sistema T4S.	15
Figura 8. Procesamiento del DNA durante la transferencia de R388.	17
Figura 9. Modelo de replicación conjugativa en la célula receptora.	18
Figura 10. Esquema de las relaciones entre las diferentes familias de relaxasas.	19
Figura 11. Estructuras del dominio relaxasa de las proteínas TrwC (A) y Tral (B).	22
Figura 12. Estructura del <i>oriT</i> en estado monocatenario tras la unión a TrwC o Tral. .	22
Figura 13. Orígenes de transferencia.	26
Figura 14. Mapa genético y funcional del plásmido pMV158.	28
Figura 15. Estructura tridimensional de RepB e interacciones con el <i>dso</i>	29
Figura 16. Circuito de control del número de copias de pMV158.	30
Figura 17. La proteína MobM.	31
Figura 18. Interacciones entre MobM y el <i>oriT</i>	33
Figura 19. Actividad relaxasa de MobM.	33
Figura 20. Orígenes de cadena retrasada de pMV158.	35
Figura 21. Modelo de transferencia del plásmido pMV158 por conjugación.	39

Figura 22. Sistema de expresión controlada de proteínas con los vectores pET en la estirpe de <i>E. coli</i> BL21(DE3).	63
Figura 23. Cristales del complejo MobMN199 con el oligonucleótido IR1+8.	74
Figura 24. Región promotora del gen <i>mobM</i> de pMV158.	84
Figura 25. Resolución de complejos específicos formados entre la región promotora del gen <i>mobM</i> y la RNAP de <i>E. coli</i> .	85
Figura 26. Mapeo del sitio de unión de la RNAP de <i>E. coli</i> en la región promotora del gen <i>mobM</i> por microscopía electrónica.	86
Figura 27. Transcripción <i>in vitro</i> con la RNAP de <i>E. coli</i> .	88
Figura 28. Iniciación de la transcripción del mRNA del gen <i>mobM</i> en <i>E. coli</i> (1) y <i>S. pneumoniae</i> (2).	89
Figura 29. Esquema de la proteína MobM y MobMN199.	94
Figura 30. Pasos en la purificación de la proteína MobMN199.	95
Figura 31. Perfil de ultracentrifugación analítica de MobMN199.	97
Figura 32. Actividad de corte de MobM, MobMN199 (A) y MobMN199His (B) sobre DNA superenrollado de pMV158.	98
Figura 33. Actividad de corte de MobMN199 en presencia de diferentes cationes divalentes.	99
Figura 34. Análisis de la estructura secundaria de MobMN199.	100
Figura 35. Análisis de la estabilidad térmica de MobMN199 (15 μ M).	102
Figura 36. Actividad de corte/cierre de MobMN199 tras el tratamiento de desnaturalización térmica, con o sin metales divalentes.	103
Figura 37. Estabilidad térmica de MobMN199 (15 μ M) con diferentes concentraciones de MnCl ₂ .	105
Figura 38. Árbol filogenético y alineamiento de la secuencia del <i>oriT</i> de la familia de plásmidos de replicación por círculo rodante (RC) de pMV158.	110
Figura 39. Representación de las posibles estructuras secundarias que se pueden formar en la cadena transferente del <i>oriT</i> de pMV158.	111
Figura 40. EMSA con DNA bicatenario lineal (A) o superenrollado (B y C).	113
Figura 41. Mapeo de los sitios de unión de la proteína MobM en el plásmido pMV158 mediante microscopía electrónica.	114
Figura 42. Capacidad de unión MobM o MobMN199 a IR2, IR3 y ORIT.	115
Figura 43. Aproximación experimental para el análisis de las interacciones entre MobM y el <i>oriT</i> mediante <i>footprinting</i> sobre DNA superenrollado.	116
Figura 44. <i>Footprinting</i> con DNasa I de MobM unida al <i>oriT</i> sobre DNA superenrollado de pMV158.	118
Figura 45. <i>Footprinting</i> con DMS de MobM unida al <i>oriT</i> sobre DNA superenrollado de pMV158.	119
Figura 46. <i>Footprinting</i> con permanganato potásico de MobM unida al <i>oriT</i> sobre DNA superenrollado de pMV158.	121
Figura 47. <i>Footprinting</i> con permanganato potásico (KMnO ₄) de la cadena no-transferente del <i>oriT</i> de pMV158.	122
Figura 48. Estequiometría de unión de MobMN199 por los oligonucleótidos IR3 (A) y ORIT (B).	123
Figura 49. EMSA con MobMN199 y oligonucleótidos con la secuencia del <i>oriT</i> .	125

Figura 50. Esquema representativo de los oligonucleótidos empleados en la definición de la secuencia mínima del <i>oriT</i> de pMV158 reconocida por MobMN199 en conformación de cadena sencilla.	126
Figura 51. Competición entre IR3-Cy5 y el mismo oligonucleótido (A), el oligonucleótido ORIT (B), IR1+8 (C), o los oligonucleótidos IR1, IR3-R y 10-NIC (D).	127
Figura 52. Cinética de competición de IR3 (A) e IR1+8 (B) sobre los complejos formados por MobMN199 y el oligonucleótido marcado IR3-Cy5.	128
Figura 53. Influencia de la unión de DNA en la estabilidad térmica del dominio relaxasa de la proteína MobM.....	129
Figura 54. Estructura tridimensional de MobMN199 unida al oligonucleótido IR1+8.	130
Figura 55. Comparación entre plegamiento del dominio relaxasa de MobM (en rojo) con las proteínas TrwC (violeta) y Tral (marrón).....	130
Figura 56. Mapa de interacciones entre MobM y el DNA del <i>oriT</i>	131
Figura 57. Centro activo de MobM.	132
Figura 58. Actividad de corte de MobM(Y44F) y MobM.	133
Figura 59. Comparación entre las estructuras de TrwCN293 (izquierda) y MobMN199 (derecha) indicando la posición de los extremos 3' de los respectivos DNAs empleados en la obtención de los cocristales.	134
Figura 60. Propiedades de la proteína MobMN243.....	135
Figura 61. Características de los mutantes en los <i>sso</i> de pMV158.....	140
Figura 62. Procedimiento experimental (A) y esquema de la distribución (B) de los ensayos de conjugación en filtro con placas multipocillo.	142
Figura 63. Correlación entre emisión de fluorescencia y frecuencia de transferencia de pMV158GFP.....	144
Figura 64. Expresión del gen <i>gfp</i> en células portadoras del plásmido pMV158GFP.	144
Figura 65. Frecuencias de movilización de pMV158 y derivados deficientes en los <i>sso</i> desde <i>S. pneumoniae</i> con pAM β 1 hacia un receptor de <i>S. pneumoniae</i> (barra gris) o de <i>E. faecalis</i> (barra rayada).....	146
Figura 66. Acumulación de formas ssDNA de pMV158 y derivados con mutaciones en <i>ssoA</i> o en <i>ssoU</i> (A) o en ambos <i>sso</i> (B), en <i>S. pneumoniae</i>	148
Figura 67. Acumulación de formas monocatenarias de pMV158 y derivados con mutaciones en <i>ssoA</i> o en <i>ssoU</i> (A) o en ambos <i>sso</i> (B), en <i>E. faecalis</i>	148
Figura 68. Análisis del circuito regulador de MobM en <i>E. coli</i>	152
Figura 69. Árbol filogenético y alineamiento de la secuencia de la región aminoterminal de las proteínas de tipo MobM pertenecientes a la familia de plásmidos RCR de pMV158.	154
Figura 70. Superposición de los centros activos de las relaxasas MobM-26DNA y TrwC-25DNA-Ni ²⁺	160
Figura 72. Modelo de interacción proteína-DNA en el inicio de la transferencia.....	162
Figura 73. Funcionalidad del <i>oriT</i> en el inicio y la terminación de la transferencia conjugativa.	164
Figura 74. Correlación entre la estructura tridimensional y los datos de <i>footprinting</i> sobre DNA superenrollado.	166
Figura 75. Modelo de síntesis de doble cadena después de la transferencia de pMV158.	169

Abreviaturas:

A	Absorbancia
Ap	Ampicilina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
CD	Dicroísmo circular
Ci	Curios
Cm	Cloramfenicol
Cy5	Indocarbocianina-5
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
DMS	Dimetil sulfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DOC	Deoxicolato
DR	Repetición directa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
dsDNA	DNA de doble cadena
<i>dso</i>	Origen de replicación de cadena doble
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico
Em	Eritromicina
EMSA	Ensayos de movilidad diferencial en geles nativos
Fig.	Figura
G+	Gram-positiva
G-	Gram-negativa
GFP	Proteína fluorescente verde
HGT	Transferencia genética horizontal
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
ITC	Calorimetría isotérmica de valoración
kb	Kilobase, kilopares de bases
Km	Kanamicina
IR	Repetición invertida
kDa	Kilodalton

min	Minutos
mRNA	RNA mensajero
<i>nic</i>	Sitio de corte
Nov	Novobiocina
<i>oriT</i>	Origen de transferencia
PAA	Poliacrilamida
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PEI	Poli-etilenimina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rif	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
Se-Met	Selenio-metionina
ssDNA	DNA de cadena sencilla
sso	Origen de replicación de cadena retrasada
T-DNA	DNA transferente por conjugación
Tc	Tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-diamina
Tris	Trihidroximetil-amino-metano
U	Unidad(es) enzimática(s)
U.A.	Unidades de Absorbancia
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1. PLÁSMIDOS BACTERIANOS

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos con capacidad para autoreplicarse de forma controlada, con ayuda de factores codificados en el DNA cromosómico del huésped y de forma coordinada con la división celular bacteriana. En la mayoría de los casos son circulares y bicatenarios, pudiendo variar en tamaño (<1-500 Kb) y en número de copias (1-30 copias/célula), manteniéndose estables en las poblaciones bacterianas a través de procesos de transferencia vertical y horizontal. Aunque se suele considerar material genético dispensable, la mayoría de los plásmidos proporcionan una gran variedad de fenotipos a sus huéspedes, reportándoles algún tipo de ventaja evolutiva a través de una relación simbiótica. Ejemplos de ello pueden ser la capacidad para degradar compuestos orgánicos, fijar nitrógeno, conferir resistencia a radiación, antibióticos o metales pesados, y producción de bacteriocinas. Así, los plásmidos pueden constituir entre un 1 y un 15% del genoma de muchas especies bacterianas y representan vehículos portadores de genes que, dependiendo del número de copias plasmídico, se encuentran en dosis más elevadas que en el cromosoma, y además pueden dispersarse por transferencia genética horizontal.

1.1. Clasificación

Existen diferentes estrategias para clasificar y establecer relaciones entre plásmidos. El primer sistema de clasificación atendía a características relacionadas con la capacidad de transferencia por conjugación y con la capacidad de inhibir la transferencia del plásmido F. Sin embargo, el descubrimiento y estudio de nuevos plásmidos, incluyendo aquellos que no pertenecían a enterobacterias o no eran auto-transmisibles, requería un nuevo esquema. Dado que es posible encontrar varios plásmidos en una célula, surgió una clasificación basada en *grupos de incompatibilidad* (Datta & Hedges, 1971), incluyendo en una misma familia a aquellos plásmidos relacionados que no son capaces de mantenerse y de ser heredados de forma estable en la misma línea celular, debido a que comparten los mecanismos de replicación y control. Hoy día, este análisis de incompatibilidad ha quedado obsoleto debido a: i) el gran número de plásmidos identificados que no pueden replicar en un huésped común, y ii) mutaciones puntuales en los elementos de control hacen que se pierda la incompatibilidad (López *et al.*, 1989). La secuenciación de DNA ha permitido el diseño de estrategias muy fiables de clasificación, basadas en el análisis y comparación de las regiones del plásmido que codifican funciones de replicación y

transferencia horizontal. Según la base de datos de replicones plasmídicos (*DPR*, Database Plasmid Replicons), pueden definirse 17 familias de plásmidos que replican por el mecanismo de círculo rodante (RC) y 5 familias con replicación tipo theta. Sin embargo, esta base de datos ha quedado obsoleta por falta de actualización desde el año 2000. Por otro lado, recientemente se ha publicado un sistema de clasificación de plásmidos conjugativos basado en la comparación de las secuencias de las proteínas iniciadoras de la transferencia (relaxasas), donde pMV158 es el plásmido representante de una de las seis superfamilias definidas (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009; ver más adelante).

1.2. Mecanismos de replicación y control

La única región esencial para un plásmido es aquella en la que se encuentran los genes y las secuencias específicas implicadas en la replicación y el control del número de copias. Este módulo, conocido como replicón básico, se compone de: i) un origen de replicación (*ori*); ii) genes *cop / inc*, relacionados con el control del inicio de la replicación; y iii) genes *rep*, que codifican proteínas iniciadoras de la replicación. Tras el ensamblaje de todas las proteínas sobre el origen de replicación (replisoma), los plásmidos usan dos estrategias generales para iniciar el proceso replicativo (del Solar *et al.*, 1998):

Replicación tipo theta. El nombre que define este tipo de replicación proviene de la forma similar a la letra griega θ (theta) que adquieren los intermediarios de replicación al ser visualizados mediante microscopía electrónica. Este mecanismo implica la apertura de las dos hebras de DNA en una región del origen con alto porcentaje A/T y la síntesis de fragmentos de RNA (pRNA) que sirven como cebadores para la iniciación de la replicación bidireccional de DNA, de forma continua sobre la cadena líder y discontinua sobre la cadena retrasada. En la mayoría de los casos se necesita una proteína iniciadora Rep y, según el replicón, pueden ser dependientes o no de la actividad de la DNA polimerasa I (Pol I). Así, en los plásmidos dependientes de Pol I, el replisoma se ensambla después de la síntesis inicial de la cadena líder por esta enzima. Por el contrario, el ensamblaje del replisoma en los plásmidos independientes de Pol I incluye interacciones macromoleculares que causan la apertura del origen y la carga sucesiva de la helicasa, primasa y DNA polimerasa III. El plásmido RSF1010 representa una variante de replicación de tipo theta (denominada *replicación por desplazamiento de cadena*) que no solo es independiente de Pol I, sino también de la

actividad helicasa y primasa de la célula, lo cual justifica su amplio rango de huésped (revisado en Espinosa *et al.*, 2000).

Replicación por círculo rodante (RC). Este tipo de replicación se ha observado en un gran número de plásmidos de pequeño tamaño (<10 kb) aislados de bacterias G+ (como es el caso del plásmido pMV158), G- y Arquea. El mecanismo de replicación RC es unidireccional y asimétrico, ya que la síntesis de las cadenas líder y retrasada no está acoplada (Fig. 1). Este tipo de replicación comparte muchas similitudes con el proceso de transferencia genética horizontal por conjugación (Waters & Guiney, 1993). En concreto, el proceso es iniciado por la proteína Rep, tras reconocer el origen de cadena doble (*dso*) e introducir, a través de un residuo Tyr situado en el centro activo, un corte sobre el enlace fosfodiéster de un dinucleótido específico, solo 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, esencialmente las DNA polimerasas I y III, una helicasa y la proteína de unión a DNA de cadena sencilla, SSB. 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). En este punto de la replicación coexiste una molécula plasmídica, compuesta por la cadena parental molde y la cadena líder de nueva síntesis, y un intermediario replicativo monocatenario (ssDNA) y circular, que corresponde a la cadena parental líder desplazada (te Riele *et al.*, 1986). Estos intermediarios de ssDNA, distintivos de la replicación por círculo rodante, se convierten posteriormente en plásmidos bicatenarios (dsDNA) a partir del origen de cadena retrasada (*sso*), donde la RNA polimerasa sintetiza un cebador de RNA, que es extendido de forma consecutiva por Pol I y Pol III (Kramer *et al.*, 1997). Por último, la ligasa cierra los extremos del dsDNA resultante y la girasa produce el superenrollamiento del mismo (revisado en Espinosa *et al.*, 2000).

De las tres etapas de la replicación (iniciación, elongación y terminación), es en la iniciación cuando los plásmidos estudiados hasta la fecha controlan su número de copias. En todos los casos, esta regulación se realiza mediante sistemas de control negativo basados en diferentes estrategias: i) pequeños RNAs contratranscritos (ctRNA), que aparean por complementariedad y bloquean RNAs esenciales para la replicación (pRNA o mRNA de *rep*); ii) iterones, repeticiones directas de DNA que secuestran la proteína Rep o influyen en su autorregulación, o bien desactivan el origen de replicación por el mecanismo de *handcuffing* (Chattoraj, 2000); o iii) la acción

combinada de una proteína represora que inhibe la transcripción de los genes *rep*, y un ctRNA que inhibe la traducción de las proteínas Rep (del Solar & Espinosa, 2000).

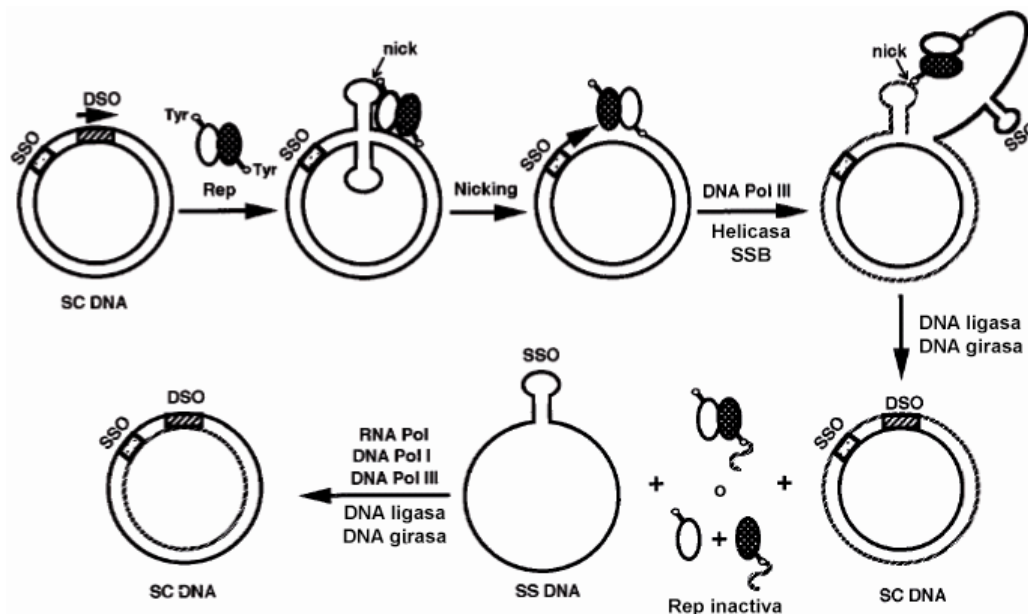


Figura 1. Modelo de replicación por círculo rodante del plásmido pT181.

La proteína Rep (dimérica) reconoce el origen de replicación (*dso*) sobre DNA superenrollado (SC) y genera un extremo 3'-OH, desde el que se inicia la síntesis de la cadena líder. Cuando el replisoma alcanza nuevamente el *dso*, la proteína Rep cataliza una reacción de transesterificación que libera una molécula plasmídica de doble cadena y un intermediario replicativo monocatenario (ssDNA). A partir del origen de cadena retrasada (*sso*), expuesto en los intermediarios de ssDNA, se genera una segunda copia de plásmido bicatenario. Por último, la ligasa cierra los extremos del dsDNA resultante y la girasa produce el superenrollamiento del mismo. Modificado de Khan, 1997.

1.3. Rango de huésped

La mayoría de los plásmidos de bacterias G- (como ColE1, pSC101, P1, F, R6K y R1) solo pueden replicar y mantenerse de forma estable en un número limitado de huéspedes muy relacionados entre sí. Otros plásmidos, como RK2, RP4 y RSF1010, especialmente este último, han desarrollado diferentes estrategias que les permiten extenderse a la gran mayoría de los huéspedes G- y a alguna bacteria G+. En bacterias G+, muchos plásmidos que replican por los mecanismos tipo theta o RC presentan un rango de huésped medio-alto, pudiendo establecerse en bacterias no relacionadas entre sí (incluyendo G-), razón por la que se denominan plásmidos promiscuos. Aunque los plásmidos son capaces de controlar de forma autónoma la frecuencia de inicio de la replicación, dependen, en mayor o menor medida, de la maquinaria sintética de la célula en la que se hospedan, tanto para el ensamblaje del

replisoma como para las siguientes etapas de elongación y terminación. Esto implica la existencia de una comunicación adecuada entre los factores específicos del plásmido y los del huésped, incluyendo: i) un equilibrio entre la transcripción y traducción de los genes encargados de la replicación y control; ii) unos niveles de superenrollamiento adecuados; y iii) la interacción apropiada con proteínas reguladoras (H-NS, Hfq) o proteínas de tipo histona (HU, IHF, FIS), implicadas en la curvatura del DNA y la formación del replisoma (revisado en Espinosa *et al.*, 2000). No obstante, un estudio reciente a nivel genómico ha demostrado que, al menos en *Escherichia coli*, no hay genes cromosómicos con un papel esencial en la conjugación plasmídica, sugiriendo que este mecanismo actúa como un sistema de inyección de DNA que no tiene en cuenta la constitución de la célula receptora (Pérez-Mendoza & de la Cruz, 2009).

2. TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL

La transferencia genética horizontal (HGT, *horizontal gene transfer*) hace referencia a los eventos de intercambio de material genético entre bacterias no relacionadas filogenéticamente o incluso con organismos eucarióticos. Este fenómeno supone una fuerza evolutiva importante en la organización, adaptación y especialización de los genomas bacterianos en diversos nichos medioambientales. La HGT requiere una maquinaria compleja de proteínas que hacen posible el paso de una molécula de DNA a través de la barrera que supone la envuelta celular bacteriana. Los tres sistemas HGT descritos son la *transformación*, la *transducción* y la *conjugación*.

La *transformación* fue el primer mecanismo HGT descubierto (Griffith, 1928) y se define como un cambio genético estable producido al incorporar DNA desnudo (sin proteínas asociadas), desde el exterior celular. El proceso supone una liberación de DNA en el ambiente, bien por muerte celular o por secreción activa de células vivas, que luego interacciona con receptores de superficie de células competentes y se introduce hacia el citoplasma en forma de ssDNA. Si esta molécula no tiene capacidad autoreplicativa podría integrarse en el genoma bacteriano mediante recombinación homóloga, dependiendo del grado de similitud de secuencia. Esta limitación supone que la incorporación de DNA extracelular mediante transformación solo es posible entre especies bacterianas estrechamente relacionadas (Claverys *et al.*, 2009).

La *transducción* se define como el proceso de transporte de DNA de una célula a otra a través de un virus bacteriano (bacteriófago). Tras la absorción del bacteriófago a la superficie bacteriana y la inyección del DNA en el interior celular, el ciclo de reproducción vírico puede ser lítico o lisogénico. En el primero, el DNA vírico replica rápidamente para generar nuevas partículas virales que finalmente rompen la célula y continúan la infección. En el segundo, el DNA vírico se integra en el genoma bacteriano (profago), y replica de acuerdo con la división celular hasta que entra nuevamente en fase lítica en respuesta a estímulos ambientales. Algunas veces, durante la escisión del DNA profágico (estado lisogénico) o el empaquetado del DNA en la cápsula (estado lítico), parte del DNA del huésped también puede ser procesado y transferido a otras células. Como ocurre en la transformación, este DNA debe integrarse en el genoma de la célula receptora, lo cual también supone un límite en el rango de huésped.

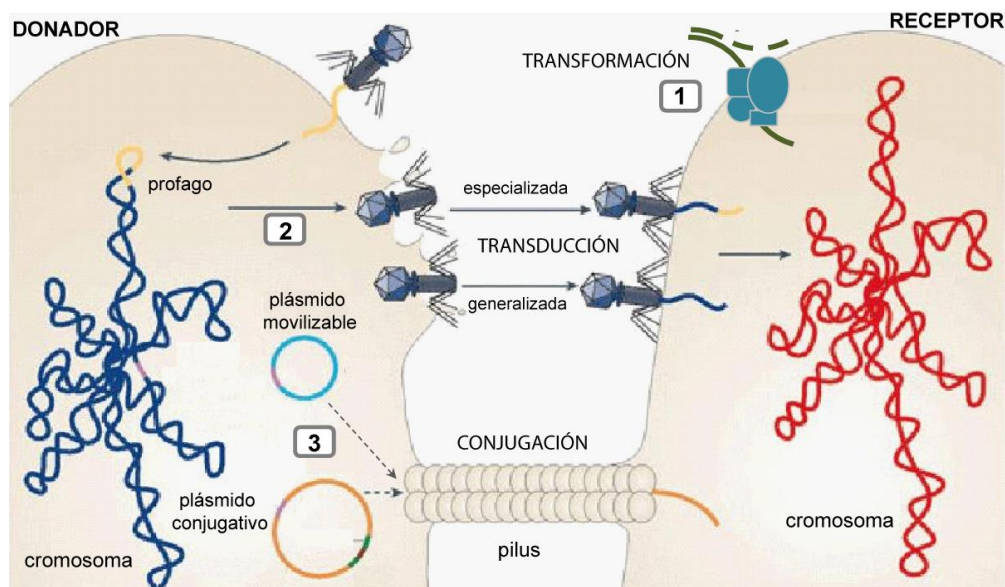


Figura 2. Transferencia de DNA entre células bacterianas.

En la transformación (1) el DNA libre de doble cadena es procesado mediante helicasas y exonucleasas para introducirlo en la célula en estado monocatenario. En la transducción (2) el DNA genómico de un bacteriófago (amarillo) se inserta en el cromosoma de la bacteria (azul) como un profago. Tras la replicación, parte del DNA del hospedador (transducción generalizada) o del DNA próximo al sitio de integración del profago (transducción especializada) se encapsula accidentalmente. Las partículas víricas infectan una nueva célula receptora, en que el DNA recombina con el cromosoma (rojo). En la conjugación (3) se transfiere DNA entre dos bacterias que están en contacto mediante el pilus. Un plásmido movilizable (azul claro) puede transferirse con la ayuda de las funciones codificadas en los plásmidos conjugativos auto-transmisibles (naranja). Modificado de Frost *et al.*, 2005.

La *conjugación* es la transferencia de material genético (plásmidos o transposones) desde una célula donadora a otra receptora mediante contacto físico (Fig. 2). En este caso, el DNA transferido (T-DNA) posee su propio origen de replicación y, a diferencia de la transformación y transducción, no es necesaria su integración en genoma de la célula, lo cual permite un mayor rango de huésped (Frost *et al.*, 2005). El gran número de elementos conjugativos identificados hasta la fecha (>1000 miembros; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009) confirma que la conjugación es el mecanismo de transferencia genética horizontal más extendido y supone el mayor reservorio de genes móviles en el mundo procariota. Entre los elementos móviles, los plásmidos son unas piezas clave debido a su habilidad de transferirse mediante conjugación entre estirpes relacionadas o muy distantes desde el punto de vista filogenético. Mientras que los plásmidos conjugativos aislados en bacterias G- han sido estudiados exhaustivamente, se ha prestado menos atención a los elementos conjugativos de bacterias G+ (Grohmann *et al.*, 2003).

2.1. Modelo de transferencia de DNA por conjugación

El modelo actual de conjugación bacteriana se define como la combinación de un mecanismo de replicación de DNA por círculo rodante (Fig. 1) y un sistema de secreción de macromoléculas de tipo IV. Así, el proceso conjugativo puede considerarse, según las proteínas que intervienen, como integrado por tres módulos especializados: el relaxosoma (*Dtr*, *DNA transfer replication*), el sistema de secreción de tipo IV (T4SS, *Type IV Secretion System*) y la proteína acopladora (CP, *Coupling Protein*). En base a este modelo, los plásmidos transferibles pueden distinguirse en: i) plásmidos conjugativos (también denominados autotransferibles), en los que existe un módulo con todos los genes implicados en la transferencia por conjugación, y ii) plásmidos movilizables, portadores solamente del origen de transferencia (*oriT*) y del gen que codifica la relaxasa, de manera que solamente se transfieren cuando co-residen en la misma célula con algún elemento móvil autotransferible, que aporta el resto de la maquinaria (CP y T4SS). En este segundo grupo se encuentra el plásmido pMV158, objeto de estudio de esta tesis.

El relaxosoma está compuesto por las proteínas que preparan el DNA para ser transferido. La proteína iniciadora (relaxasa) introduce un corte específico dentro del origen de transferencia (*oriT*) solamente en la cadena que se va a transferir. Esta cadena es posteriormente desplazada de manera similar a la replicación por círculo

rodante. En este sentido, los mecanismos de replicación por círculo rodante y de transferencia por conjugación son equivalentes ya que comparten una serie de características que pueden interpretarse como una solución común a la propagación vertical y horizontal del DNA plasmídico (Espinosa *et al.*, 2005; Novick, 1998). En ambos procesos, 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 comparten motivos catalíticos y que reconocen sus respectivos sitios de unión, el *dso* (replicación) o el *oriT* (conjugación).

El relaxosoma se conecta con el dominio citoplasmático de varios componentes del sistema T4S a través de la proteína acopladora (CP), la cual participa con el T4SS en el bombeo del DNA hacia la célula receptora. El sistema T4S es un conjunto de proteínas que se ensamblan para formar un canal transmembrana que, tras establecer los contactos intercelulares, es capaz de bombear el complejo Relaxasa-T-DNA desde una célula a otra. Este tipo de transportador es empleado por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* para transferir el plásmido pTi a células de plantas (Christie, 2001) y por patógenos animales para inyectar factores de virulencia en células diana (Ding *et al.*, 2003; Llosa *et al.*, 2009).

2.2. Bases moleculares de la conjugación

Los mecanismos moleculares que ocurren durante la conjugación se han estudiado detalladamente en varios sistemas, sobre todo en plásmidos conjugativos de bacterias G- y en el transporte de T-DNA del plásmido pTi desde *A. tumefaciens* a plantas leguminosas. A pesar de las particularidades que comprenden cada uno de estos sistemas, se podrían enumerar una serie de reacciones comunes que ocurren durante el proceso de transferencia:

I. *Expresión de los genes implicados en la transferencia conjugativa*: Los plásmidos de la familia Ti poseen un sistema de regulación transcripcional de tipo “Quorum-sensing”, que responde de forma jerárquica a varias señales. Así, ciertos nutrientes liberados por células de plantas infectadas por el DNA plasmídico (denominados “opinas”), favorecen la síntesis de una hormona producida por la propia bacteria. A su vez, esta hormona activa a la proteína TraR, un inductor de la expresión de los genes implicados en la transferencia (Oger & Farrand, 2002). En la familia de plásmidos de tipo F se ha observado que la expresión génica está controlada mediante un sistema

complejo, donde TraJ es el activador inicial de la transcripción de los genes *tra* y de los reguladores TraM y TraY (Fig. 3).

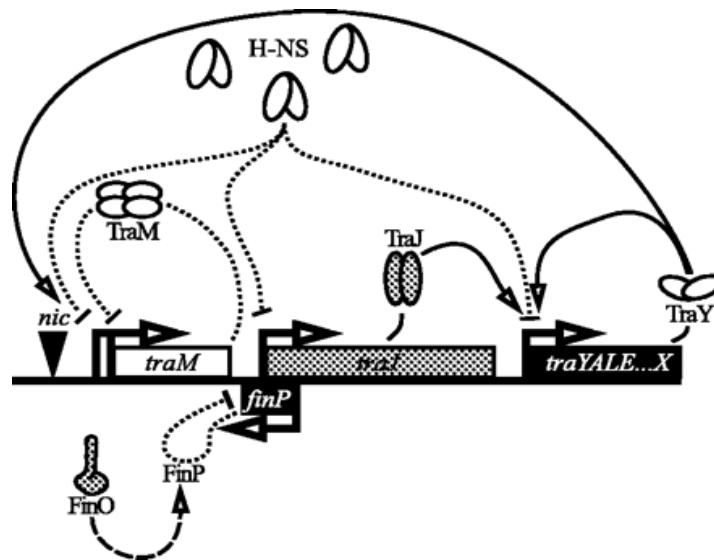


Figura 3. Circuito regulador de los genes de transferencia de plásmidos tipo F.

Los efectos positivos o negativos en la transcripción se indican, respectivamente, mediante líneas continuas que acaban en puntas de flecha, o mediante líneas discontinuas que acaban en barra (ver los detalles del mecanismo en el texto). Tomado de Will & Frost, 2006a.

Mientras que la proteína de unión a RNA del huésped (Hfq) reprime la síntesis de TraJ y TraM mediante desestabilización de sus respectivos mRNAs (Will & Frost, 2006a), la proteína asociada a nucleoside (H-NS) reprime el operón *tra*. Así, se piensa que la activación de la expresión se debe a que TraJ bloquea la acción de H-NS (Will & Frost, 2006b). Por otro lado, los niveles de TraJ dependen de un sistema inhibidor denominado FinOP. FinP es un RNA contratranscrito complementario al mRNA *traJ* y FinO es una chaperona que estabiliza este híbrido, bloqueando la síntesis de TraJ a nivel traduccional (Gubbins *et al.*, 2003). Además, según se ha observado en el plásmido de virulencia pLST (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium), tanto *finP* como *traJ* están regulados a nivel transcripcional por una DNA metilasa de adeninas, elevando el nivel de complejidad en la regulación de este circuito plasmídico (Camacho *et al.*, 2005a; Camacho & Casadesús, 2005b). Curiosamente, en el caso específico del plásmido F se ha observado que el gen *finO* no es funcional debido a una inserción de un elemento transponible (IS3a) dentro de la región codificante. Por ello, los niveles de conjugación del plásmido F son muy elevados, exhibiendo unas frecuencias de transferencia cercanas a 1.

II. *Formación del par conjugativo*: Una vez que se han sintetizado las proteínas necesarias, la conjugación plasmídica comienza cuando las dos células implicadas (donador y receptor) entran en contacto físico. Si la formación del par conjugativo ocurre entre dos células que contienen el mismo plásmido (o similar) se activa el sistema de exclusión de entrada (revisado en Garcillán-Barcia & de la Cruz, 2008), bien mediante proteínas de superficie (TraT de F) que probablemente impiden la unión del *pili* (Riede & Eschbach, 1986) o bien mediante proteínas de la membrana interna (TraS de F o TrbK de RP4) que bloquean la entrada del DNA (Haase *et al.*, 1996). En bacterias G⁺ la interacción celular parece ocurrir mediante proteínas de adhesión (Grohmann *et al.*, 2003), y en bacterias G⁻ se lleva a cabo a través de la extensión del *pilus conjugativo* desde la célula donadora (Anthony *et al.*, 1994). Mientras que en el plásmido F de *E. coli*, el *pilus* se retracta para juntar las células implicadas (Lawley *et al.*, 2003), los sistemas pTi, RP4, R388 y pKM101 carecen de esta capacidad de contracción (Zechner *et al.*, 2000), y probablemente funcionan como estructuras de adhesión que promueven la agregación celular, de forma similar al sistema pCF10 en *E. faecalis* (Dunny & Leonard, 1997). Así, dependiendo de que el medio de conjugación sea sólido o líquido, este factor supone un condicionante en la eficiencia de la transferencia plasmídica de unas células a otras (Tabla 1).

Tabla 1. **Plásmidos conjugativos modelo de bacterias Gram-negativas.**

Grupo de Incompatibilidad (Familia*)	Prototipo	Pili	Medio de Conjugación
IncF (MOB _F)	F/R1/R100	Flexible	líquido
IncI (MOB _P)	Collb-P9/R64	Rígido-Flexible	semisólido-líquido
IncN (MOB _F)	R46/pKM101	Rígido	sólido
IncP (MOB _P)	RP4/RK2	Rígido	sólido
IncW (MOB _F)	R388	Rígido	sólido
IncX (MOB _P)	R6K	Flexible	semisólido

Extraído de Zechner *et al.*, 2000 (*según Garcillán-Barcia *et al.*, 2009).

III. *Señales inductoras de la conjugación*: Se asume que el relaxosoma se encuentra ensamblado en el *oriT* y sólo se activa en función a señales inductoras la conjugación (Lanka & Wilkins, 1995). En ausencia de estas señales, la molécula plasmídica seguiría su ciclo replicativo y el relaxosoma sería desplazado por la maquinaria de replicación vegetativa. A pesar de que actualmente se desconoce la naturaleza de estas señales efectoras, se ha observado que la proteína TraM (codificada en los

plásmidos F y R1), intensifica la actividad relaxasa e interacciona con la proteína acopladora tras unirse al *oriT* (Beranek *et al.*, 2004; Ragonese *et al.*, 2007). En el plásmido F hay otras dos proteínas auxiliares implicadas en la formación del relaxosoma: el factor de integración del huésped IHF (*integration host factor*) y la proteína TraY, codificada por el propio plásmido. Ambas proteínas se unen en varios sitios del *oriT* y distorsionan el DNA (Luo *et al.*, 1994) para generar un sustrato adecuado de corte para la relaxasa Tral (Fig. 4A). Aunque TraM no es esencial para la formación del relaxosoma, su unión específica alrededor de las regiones de reconocimiento de IHF supone un estímulo para la actividad relaxasa (Ragonese *et al.*, 2007). En el caso del plásmido R388, el relaxosoma está formado por la unión de relaxasa TrwC y las proteínas accesorias IHF y TrwA (Fig. 4B). Mientras que TrwA estimula el proceso conjugativo (Moncalián *et al.*, 1997), IHF se une específicamente a dos sitios del *oriT* y reprime la reacción de corte por TrwC. Por ello, se piensa que el inicio del procesamiento conjugativo del DNA en R388 puede estar mediado por el abandono de IHF del *oriT* (Moncalián *et al.*, 1999a). Por otro lado, algunos plásmidos conjugativos de *Enterococcus faecalis* responden a feromonas peptídicas codificadas en el cromosoma de células potencialmente receptoras (Clewell *et al.*, 2002). Concretamente, la proteína tetramérica PrgX del plásmido pCF10 se desestabiliza tras unirse a una feromona peptídica, de manera que se desencadenan los cambios estructurales necesarios en el *oriT* para iniciar la conjugación (Shi *et al.*, 2005).

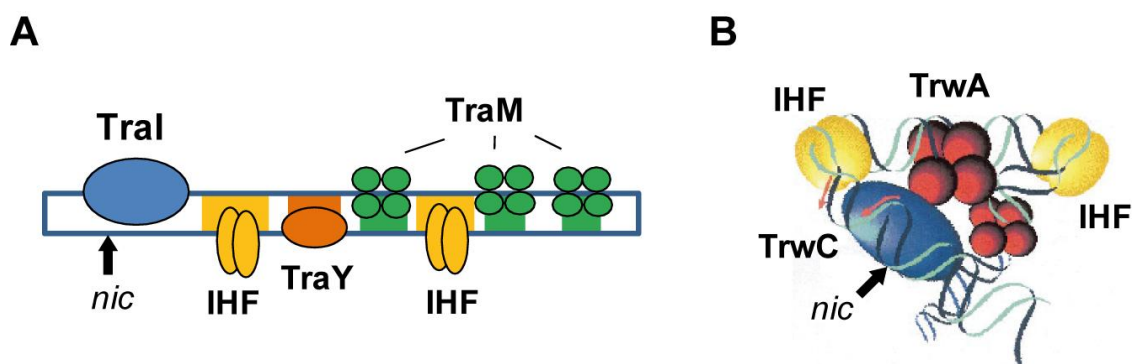


Figura 4. Ensamblaje de proteínas del relaxosoma de los plásmidos F y R388.

A) Se muestra una representación del *oriT* de F en la que aparecen las zonas de unión de las proteínas accesorias IHF (amarillo), TraM (verde) y TraY (naranja), el sitio *nic* (flecha) y la relaxasa Tral (azul). Los sitios de reconocimiento de cada proteína se representan en el mismo color. Modificado de Ragonese *et al.*, 2007. **B)** Modelo de la arquitectura del relaxosoma de R388, donde la unión de IHF bloquea la apertura del sitio *nic* y se inhibe la actividad relaxasa de TrwC. Por el contrario, la proteína TrwA (en rojo), homóloga a TraY de F, estimula el proceso conjugativo. Modificado de Moncalián *et al.*, 1999a.

IV. *Actividad relaxasa*: La proteína iniciadora de la conjugación es una endonucleasa que corta específicamente en una de las cadenas del *oriT*, de manera que el plásmido superenrollado pasa a estar topológicamente relajado. Por esta razón, estas proteínas con actividad topoisomerasa-I se han definido genéricamente como *relaxasas*. Los contactos que la relaxasa establece con el *oriT* tienen lugar en la región que incluye el sitio de corte y el brazo proximal de una repetición invertida ubicada a 5' del mismo. Los detalles bioquímicos y estructurales de esta reacción se conocen muy bien en varios sistemas, y en todos ellos se requiere que el DNA que contiene el sitio de corte esté desapareado, en forma monocatenaria (Pansegrau & Lanka, 1996a; Guasch *et al.*, 2003; Datta *et al.*, 2003; Larkin *et al.*, 2005).

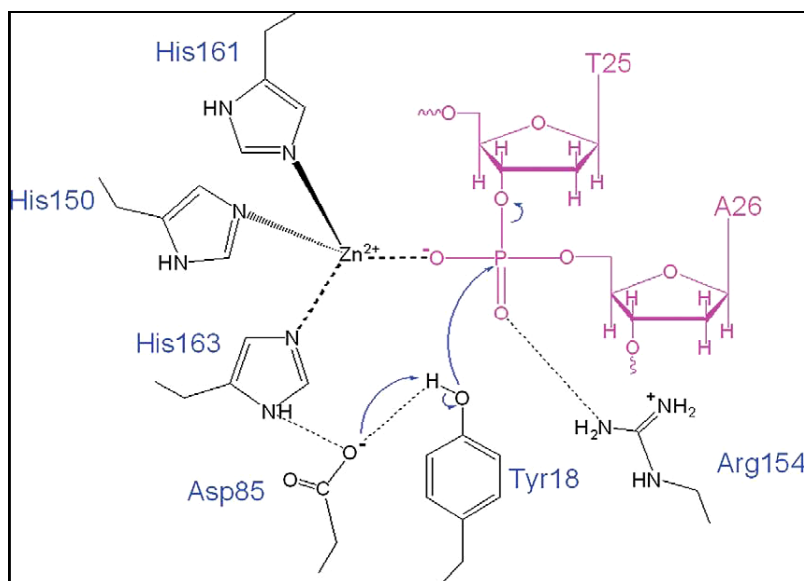


Figura 5. Mecanismo catalítico de TrwC en el inicio de la transferencia.

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.

El sitio activo de la proteína se compone por un residuo Tyr y un motivo HUH (residuos: His-hidrofóbico-His) capaz de coordinar un catión divalente conjuntamente con otro residuo His y un residuo Asp. El metal favorece la unión del ssDNA con la proteína y es el responsable del posicionamiento correcto del enlace fosfato para que el oxígeno del residuo catalítico Tyr ejerza su ataque nucleofílico. La interacción con el metal aumenta la electronegatividad de uno de los oxígenos del grupo fosfato, de forma que el fósforo, parcialmente más positivo, es una buena diana para el ataque nucleofílico. Además, la combinación de las tres His y el Asp permiten una alta afinidad por el metal sin comprometer la interacción con el ssDNA, a pesar de encontrarse muy cerca de un residuo ácido (el residuo catalítico). Se piensa que el

residuo Asp, aparte de formar un puente de hidrógeno con una de las His del motivo HUH, podría actuar como base para extraer el protón del grupo hidroxilo de la Tyr catalítica y potenciar el ataque sobre el enlace fosfato (Fig. 5). Además, se ha demostrado que este residuo Asp modula la afinidad del metal coordinado a pesar de encontrarse a una distancia considerable (Larkin *et al.*, 2007).

V. *Replicación conjugativa en el donador.* Tras la reacción de corte se genera un enlace entre el extremo 5' del DNA y el residuo Tyr de la relaxasa, de manera que la proteína queda unida de forma covalente al DNA. Consecuentemente, el extremo 3'-OH generado queda libre (Pansegrau & Lanka, 1996a; Pansegrau & Lanka, 1996b; Guzmán & Espinosa, 1997) y, a modo de cebador, es susceptible de ser extendido mediante replicación por círculo rodante. No obstante, algunos autores han apuntado que la síntesis de la cadena complementaria en la célula donadora no es un requisito indispensable. En el caso del plásmido RSF1010 las copias que se transfieren por conjugación podrían ser reemplazadas fácilmente mediante replicación vegetativa (Meyer, 2009). Por otro lado, ciertos plásmidos conjugativos codifican proteínas bifuncionales, con actividad relaxasa en la región N-terminal y actividad helicasa en la región C-terminal. De esta forma, la misma proteína puede desenrollar de forma activa (consumiendo ATP) el dsDNA en sentido 5'→3', mientras la cadena no transferida actuaría de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria. Ejemplo de proteínas con actividad relaxasa/helicasa son TrwC y Tral, codificadas en los plásmidos R388 y F/R1, respectivamente. Se ha observado que un mutante de TrwC en un motivo del dominio helicasa tiene un efecto negativo en conjugación, lo que sugiere que TrwC actúa en el proceso conjugativo como un multímero seguramente asociado a su función helicasa (Llosa *et al.*, 1996). Sin embargo, muchos otros plásmidos, incluidos todos los plásmidos movilizables, no codifican proteínas con actividad helicasa, por lo que deberían reclutar la helicasa del huésped para separar las hebras del DNA. Cabe destacar que existen pocas evidencias experimentales que demuestren la replicación conjugativa en la célula donadora. En R1162 se ha definido dos regiones distintas dentro del *oriT*, una de ellas esencial para el inicio de la conjugación y la otra para la terminación (Erickson & Meyer, 1993). Empleando un vector con dos *oriTs*: i) *oriT_{ini}*, solo eficiente en iniciación y ii) *oriT_{ter}*, solo eficiente en terminación (y situado a 3' del primero), se observaron moléculas plasmídicas en las células receptoras de mayor longitud respecto a la original. Necesariamente, este fenómeno implica replicación conjugativa en la célula donadora, iniciada en el *oriT_{ini}* y terminada en *oriT_{ter}*.

VI. *Interacción entre el relaxosoma y la proteína acopladora*: La proteína acopladora (CP) es una pieza clave en todos los sistemas de transferencia conjugativa conocidos hasta el momento. Experimentalmente se ha demostrado que la CP es el factor determinante de la funcionalidad de la maquinaria conjugativa, incluso en sistemas heterólogos compuestos por un relaxosoma y un T4SS que provienen de dos plásmidos diferentes (Llosa *et al.*, 2003). Generalmente, parece existir una correlación entre la fuerza de esta interacción y la eficiencia de transferencia. En RP4 se ha observado una interacción directa entre la CP y la región C-terminal de la relaxasa (Schröder *et al.*, 2002), mientras que en otros sistemas como en F la CP contacta con otras proteínas del relaxosoma, concretamente con TraM (Disque-Kochem & Dreiseikelmann, 1997). Por otro lado, se ha demostrado que la región citoplasmática de la CP de R388 (TrwB) interacciona, además de con la relaxasa TrwC, con la proteína accesoria TrwA (Cabezón & de la Cruz, 2006). La estructura cristalográfica del dominio citoplasmático de TrwB consiste en un hexámero de subunidades idénticas y un canal central de 20 Å (Fig. 6A; Gomis-Rüth *et al.*, 2001). Se sabe que TrwB interactúa con el DNA de forma no específica y preferentemente con moléculas monocatenarias. Además, TrwB tiene capacidad de unión de nucleótidos tri- (NTPs) y bi-fosfato (NDPs), y presenta una actividad ATPasa que es sensible a pH y a la concentración de sales. Esta actividad está relacionada con la translocación del sustrato desde una célula a otra y se ha sugerido que el T-DNA podría atravesar la membrana a través del canal central de TrwB (Fig. 6B) hacia el sistema T4S.

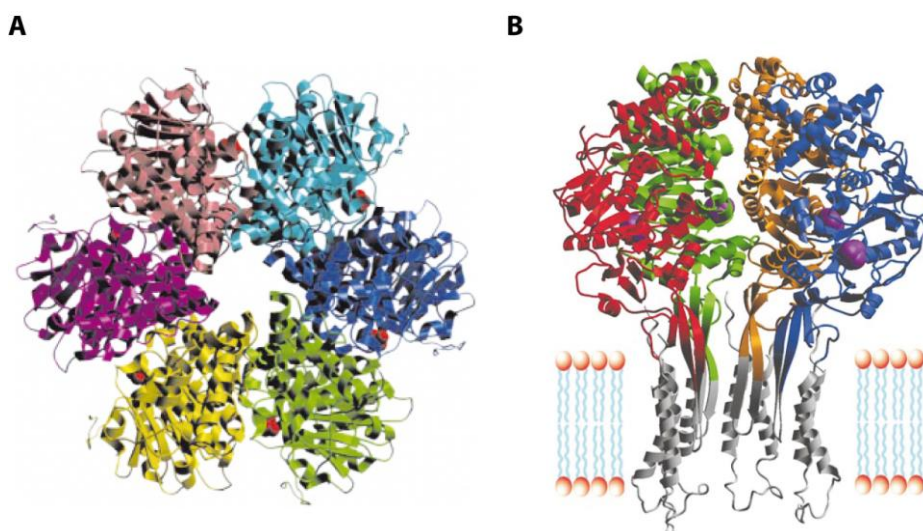


Figura 6. Características estructurales de TrwB.

A) Hexámero visto desde la cara citoplasmática, con cada uno de los protómeros en diferente color. **B)** Modelo de TrwB integrada en la membrana celular mediante las hélices- α de la región N-terminal (en gris). Modificado de Gomis-Rüth *et al.*, 2001.

VII. *Secreción activa del complejo T-DNA-Relaxasa*: El plásmido pTi de *A. tumefaciens* representa el prototipo de los sistemas T4S. Las proteínas que conforman este canal de secreción se denominan VirB y suman un total de once (Cascales & Christie, 2004a; Chen *et al.*, 2005). Recientemente se ha resuelto la estructura del sistema T4S del plásmido pKM101 mediante criomicroscopía electrónica (Fronzes *et al.*, 2009). En este caso, el complejo central está constituido por 14 monómeros de las proteínas TraN, TraO y TraF (VirB7, VirB9 y VirB10, respectivamente), mientras que el homólogo a VirB8 no forma parte del mismo.

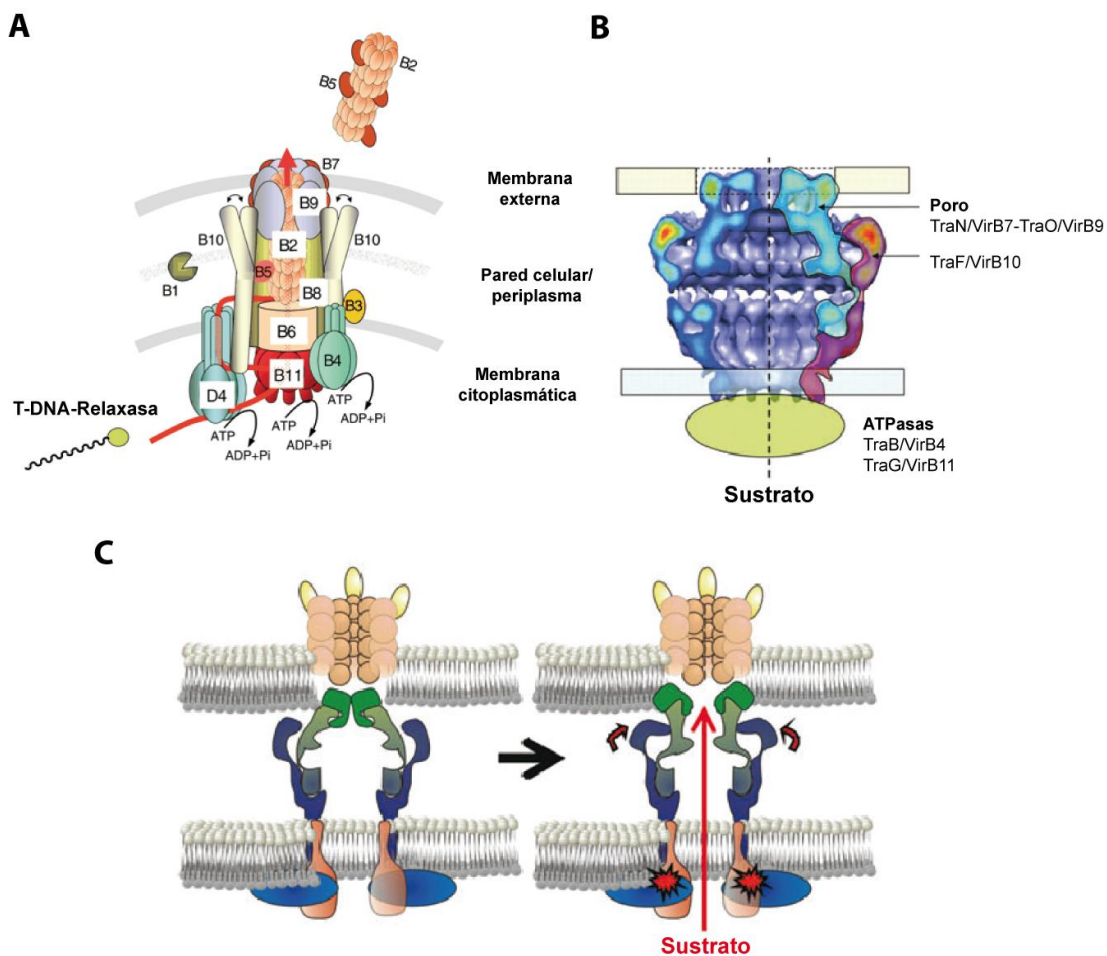


Figura 7. El sistema T4S.

A) En la figura se esquematiza el transporte del complejo T-DNA-Relaxasa a través del sistema T4S de *A. tumefaciens* (VirB/D4). La interacción está mediada por la proteína acopladora VirD4, de manera que el complejo DNA-proteína contacta sucesivamente con los componentes del canal VirB11, VirB6 y VirB8, y finalmente con VirB9 y VirB2. Los tres elementos con actividad ATPasa (VirD4, VirB4, VirB11) componen el motor del sistema y VirB10 actúa como sensor del estado energético, para bombear el DNA hacia el exterior. Modificado de Chen *et al.*, 2005. **B)** Reconstrucción tridimensional del sistema T4S del plásmido pKM101 por criomicroscopía electrónica. Modificado de Fronzes *et al.*, 2009. **C)** Modelo estructural y funcional del canal del sistema T4S, donde la proteína VirB10 es responsable de la apertura del canal formado por VirB7 y VirB9 en función al estado energético de las ATPasas citoplasmáticas. Modificado de Llosa *et al.*, 2009.

Según se indica en la Figura 7A, el complejo intermediario T-DNA-Relaxasa establece, a través de la CP, una serie de contactos secuenciales con cinco proteínas VirB del sistema T4S. La CP (VirD4 en pTi), junto con dos proteínas del T4SS (VirB4 y VirB11) compone un motor dependiente de NTPs para translocar el sustrato T-DNA-relaxasa hacia la célula receptora. Concretamente, VirD4 transfiere el sustrato hacia la proteína VirB11, ubicada en la cara interna de la membrana citoplasmática, que posteriormente entra en contacto con los componentes transmembrana VirB6 y VirB8. En este punto, VirB6 ejerce de canal hidrofílico a través del cual se controla la secreción del sustrato. El poro o canal interno, compuesto por VirB7 y VirB9, tiene un diámetro mínimo en la zona de la membrana externa de 10 Å (Fig. 7B). Así, según se representa en la Figura 7C, la apertura de esta región durante la traslocación del sustrato estaría mediada por una serie de cambios conformacionales de VirB10, en función al estado energético de las ATPasas VirB4, VirB11 y VirD4 (Cascales & Christie, 2004b; Llosa *et al.*, 2009).

VIII. *Recircularización del DNA mediante transesterificación*: Después de que el sustrato se haya transferido por completo a la célula receptora, es la propia relaxasa la que llevaría a cabo una segunda reacción de transesterificación que resulta en la recircularización del T-DNA. Numerosos trabajos han demostrado la capacidad de corte y cierre que tienen las relaxasas sobre oligonucleótidos que contienen el sitio *nic*. La reacción de cierre se lleva a cabo mediante una segunda tirosina, que puede estar ubicada en la misma molécula de proteína (como en TrwC, TraH y TraI_F) o bien por la tirosina de otra unidad de proteína (como MobA y TraI_RP4). Uno de los sistemas mejor estudiados en este sentido es el plásmido R388, en el que se ha demostrado que la relaxasa TrwC entra en la célula receptora y mantiene su actividad catalítica (Draper *et al.*, 2005). Además, cuando se emplean células receptoras que expresan anticuerpos Anti-TrwC se ha observado una inhibición específica de la transferencia conjugativa del plásmido R388 (Garcillán-Barcia *et al.*, 2007). Un estudio reciente de los intermediarios de reacción con oligonucleótidos modificados ha permitido definir un modelo detallado del mecanismo de procesamiento del DNA durante la transferencia conjugativa del plásmido R388 (González-Pérez *et al.*, 2007). En este modelo, el residuo Tyr ubicado en la posición 18 (Y18) corta el DNA para iniciar la transferencia desde la célula donadora, mientras que el residuo Y26 cierra el DNA mediante transesterificación en la célula receptora, tras reconocer la horquilla IR₂ (Fig. 8).

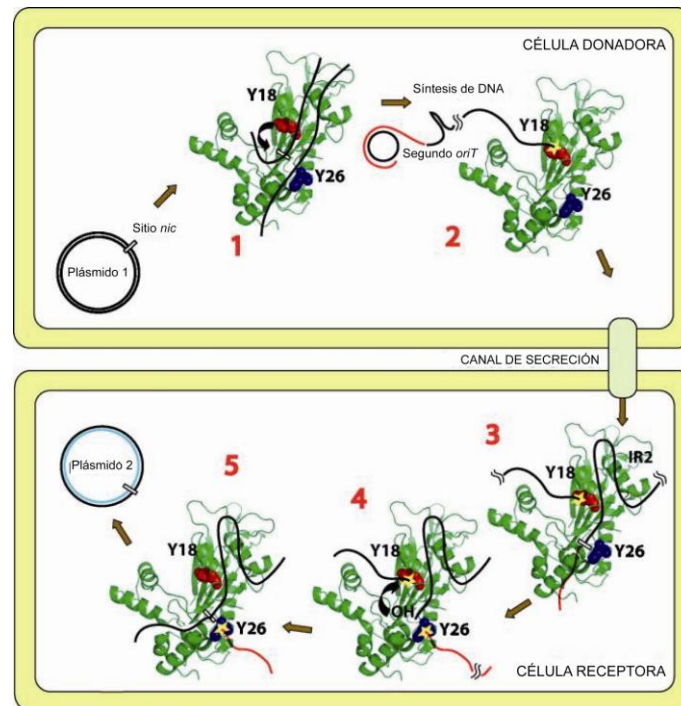


Figura 8. Procesamiento del DNA durante la transferencia de R388.

TrwC (en verde) reconoce el *oriT* del plásmido R388 (1) y la Y18 corta en el sitio *nic*, uniéndose al extremo 5' del DNA (2). El complejo proteína-DNA pasa a la célula receptora y TrwC se une al nuevo *oriT*, reconstituido por replicación RC (3). Y26 corta en el sitio *nic* del segundo *oriT* y el extremo 3'-OH generado ataca al complejo Y18-DNA (4). Tras la reacción de transesterificación la molécula de DNA queda libre (5). Modificado de González-Pérez *et al.*, 2007.

IX. *Replicación conjugativa en el receptor.* Se piensa que la síntesis de la cadena complementaria ocurre de forma simultánea a la entrada del T-DNA en la célula receptora (Lanka & Wilkins, 1995). Debido a la polaridad 5'→3' del T-DNA, la síntesis debería ser discontinua y el inicio de la misma requeriría uno o varios cebadores, dependiendo del tamaño del plásmido (Fig. 9). La eficiencia de este proceso es importante para evitar el acúmulo de formas monocatenarias de DNA, y reducir la probabilidad de daños irreparables como supone la rotura de un DNA de cadena sencilla. El plásmido R1162 representa el modelo mejor estudiado en este sentido, y se ha observado que existen diferentes mecanismos de síntesis de cadena complementaria dependiendo del huésped bacteriano (Parker & Meyer, 2005a). Concretamente, la relaxasa de R1162 contiene un dominio con actividad primasa en la región C-terminal, que es capaz de sintetizar un pequeño cebador de RNA, desde el cual se inicia la síntesis de la cadena complementaria. Este dominio primasa no solo está implicado en la replicación vegetativa sino que también actúa en la síntesis de la cadena complementaria durante la conjugación del plásmido R1162 hacia la bacteria *Salmonella enterica*. Sin embargo, esta actividad primasa es prescindible cuando la

bacteria receptora es *E. coli*, de manera que deben existir mecanismos alternativos de síntesis que aún no se han caracterizado.

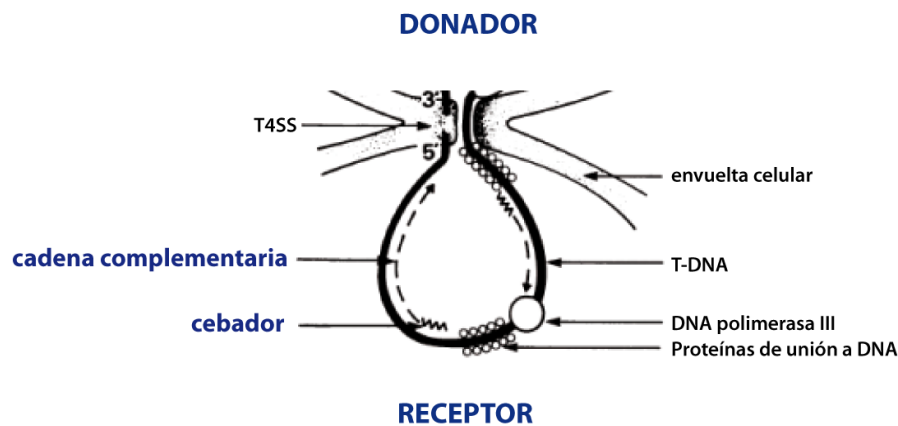


Figura 9. Modelo de replicación conjugativa en la célula receptora.

La cadena transferente (T-DNA) entra en estado monocatenario y se recubre de proteínas de unión a DNA (SSB). Esta cadena actúa de molde para la síntesis de la cadena complementaria en la célula receptora a partir de un cebador. Modificado de Willetts & Wilkins, 1984.

X. *Terminación de la conjugación:* Por último, la copia plasmídica de doble cadena recién generada es superenrollada mediante actividad girasa. En este punto acabaría el proceso conjugativo, de manera que a partir de la nueva molécula plasmídica que hay en la célula receptora se sintetizan todas las proteínas y RNAs implicados en la replicación activa del plásmido, aumentando el número de copias para asegurar su estabilidad y segregación, además de expresar factores de virulencia, resistencia a antibióticos y/o proteínas de exclusión de entrada.

2.3. Orígenes de transferencia y relaxasas

El origen de transferencia (*oriT*) es el único elemento que se requiere en *cis* para la transferencia de un plásmido por conjugación. Dependiendo del plásmido, la longitud del DNA que incluye el *oriT* puede variar entre 38 y 500 pb, pero en todos ellos se pueden definir una serie de características comunes. La parte más importante del *oriT* es una secuencia específica que incluye el sitio de corte para la relaxasa. A su vez, los *oriTs* presentan elementos implicados en la interacción DNA-proteína, tales como repeticiones directas (DR) o invertidas (IR), y regiones ricas en A+T que facilitarían formación de estructuras de tipo cruciforme y la fusión de la doble cadena en el DNA superenrollado, generando el sustrato adecuado para que la relaxasa introduzca el corte específico.

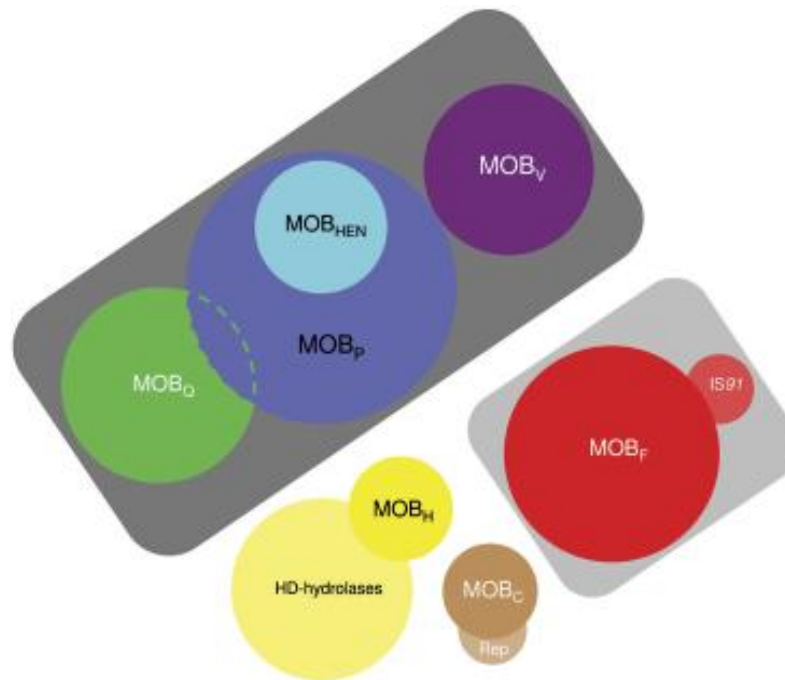


Figura 10. Esquema de las relaciones entre las diferentes familias de relaxasas.

Las relaxasas que contienen una sola tirosina activa en el centro catalítico se agrupan en un mismo *cluster* (fondo gris oscuro). Las relaxasas con dos tirosinas forman un segundo *cluster* (fondo gris claro). Las relaxasas que no forman un grupo definido (fondo blanco) no presentan homologías significativas. Las relaxasas implicadas en replicación tipo RC, las transposasas de tipo IS91, o las hidrolasas HD solapan parcialmente con algunas de las familias MOB. El área de cada círculo es proporcional al número de relaxasas. Tomado de Garcillán-Barcia *et al.*, 2009.

De forma genérica, se pueden definir las relaxasas como proteínas con actividad endonucleasa (DNA transferasa), implicadas en la iniciación de la replicación tipo círculo rodante (Rep) o bien en el inicio de la transferencia conjugativa (Mob, Tra). Estas proteínas contienen dos o más dominios funcionales y, normalmente, tanto la actividad endonucleasa como el dominio de unión a DNA se localizan en la región N-terminal, mientras que la región C-terminal podría contener dominios con actividad helicasa o primasa, además de dominios de oligomerización e interacción con otras proteínas. Las relaxasas presentan dos características comunes (Ilyina & Koonin, 1992). La primera es el motivo HUH (His-residuo hidrofóbico-His) que, junto a un tercer residuo His (HxDx₄HUH, donde x es cualquier residuo), participa en la coordinación de un catión divalente esencial para el corte del DNA. La segunda característica de las relaxasas es el residuo catalítico, normalmente Tyr, el cual ejerce un ataque nucleofílico en el enlace fosfodiéster de un dinucleótido específico del *oriT*. Cabe destacar que los motivos encontrados en las relaxasas de tipo Rep o de tipo Mob presentan permutación circular, es decir, que el orden está invertido. Así, el motivo de coordinación de metal está más próximo al extremo N-terminal que el residuo catalítico

en la familia Rep, mientras que las relaxasas de tipo Mob ocurre lo contrario (Francia *et al.*, 2004). Un trabajo reciente ha agrupado todos los plásmidos que poseen módulos de transferencia conjugativa en base a la secuencia y propiedades de sus correspondientes relaxasas (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). Concretamente, se han definido seis familias MOB distintas: MOB_F, MOB_H, MOB_C, MOB_Q, MOB_P (que incluye la subfamilia MOB_{HEN}) y MOB_V (Fig. 10).

2.3.1. Familia MOB_F

Las relaxasas de esta familia son proteínas grandes que contienen dos dominios claramente diferenciados. Mientras que el dominio relaxasa se encuentra en la región N-terminal, el dominio C-terminal presenta actividad helicasa. Los sistemas de conjugación mejor estudiados pertenecen a esta familia y están representados por las proteínas TrwC (Llosa *et al.*, 1996; (Guasch *et al.*, 2003; González-Pérez *et al.*, 2007) y Tral (Larkin *et al.*, 2005; Hekman *et al.*, 2008) de los plásmidos R388 y F, respectivamente, ambos aislados originalmente de *E. coli*. En la proteína TrwC se ha identificado una región con actividad recombinasa sitio-específica entre diferentes copias del *oriT* del plásmido R388 *in vivo* (Llosa *et al.*, 1994b; Cesar *et al.*, 2006). Las estructuras tridimensionales de la región N-terminal de TrwC y Tral muestran un plegamiento similar, consistente en un núcleo central formado por una lámina de cinco cadenas- β antiparalelas, flanqueado por hélices- α (Fig. 11). Una característica típica es la presencia de dos tirosinas catalíticas en el centro activo (Grandoso *et al.*, 2000). En TrwC, Y18 y Y26 actúan de forma secuencial en la reacción de corte y cierre del DNA durante el proceso de transferencia plasmídica (González-Pérez *et al.*, 2007). El centro catalítico también se compone por la triada de histidinas H150, H161 y H163, junto con el residuo D85, que abstrae un protón de Y18 para convertirlo en un potente nucleófilo (Guasch *et al.*, 2003). De igual forma, se ha observado que los residuos Y16 e Y23 de Tral_F son esenciales para el corte eficiente de ssDNA, aunque no influyen en su unión (Street *et al.*, 2003). Además, mediante análisis por mutagénesis se ha demostrado que la contribución de las histidinas en la coordinación del metal es asimétrica, y que la unión del metal supone un aumento en la afinidad de Tral por el DNA (Larkin *et al.*, 2007). La función helicasa de TrwC y Tral_F está relacionada con una actividad ATPasa dependiente de ssDNA e iones Mg²⁺. Esta actividad requiere la presencia de ssDNA para que se produzca el desenrollamiento, ya que las proteínas son incapaces de abrir DNA de cadena doble con extremos romos. El desenrollamiento de las cadenas se produce en dirección 5' a 3', lo que sugiere que la

proteína se une a la cadena que va a ser transferida. La actividad helicasa es esencial para la transferencia del DNA, ya que tanto un fragmento del dominio relaxasa como un mutante puntual en el motivo helicasa I, no complementan la falta de *traI* en ensayos de transferencia conjugativa del DNA (Matson *et al.*, 2001).

Los *oriT*s de la familia MOB_F son relativamente largos y complejos. El *oriT* del plásmido F incluye tres IRs, una a 3' del *nic* y dos en la región a 5' del mismo. De estas últimas, la más cercana al *nic* es la región en la que se une la relaxasa, mientras que la segunda alberga en su brazo proximal el sitio de unión de alta afinidad por IHF y en el distal, el sitio de unión de TraY. El sitio de unión a TraM y un segundo de unión a IHF se encuentran más distales del sitio *nic*, fuera de las IRs (véase Fig. 4; Tsai *et al.*, 1990; Di Laurenzio *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1993; Howard *et al.*, 1995). Las interacciones entre la relaxasa y el *oriT* se han estudiado exhaustivamente en esta familia. En el complejo de TrwC con un oligonucleótido que incluye un IR hasta el sitio de corte (25 bases), se ha observado que el DNA forma una horquilla seguida de una región desapareada que se introduce en el centro activo de la proteína (Guasch *et al.*, 2003; Fig. 12). Además, en el caso del complejo formado por Tral con un oligonucleótido de 22 bases (extendido 8 bases después del sitio de corte) se ha descrito una conformación del DNA en la que se establecen puentes de hidrógeno entre tres bases (Larkin *et al.*, 2005). Esta conformación es importante para posicionar correctamente el DNA en el centro activo, pero no contribuye significativamente a la afinidad de unión por Tral (Fig. 12; Hekman *et al.*, 2008). Se ha propuesto que la conformación del complejo DNA-proteína observada en ambos sistemas simula las interacciones que tienen lugar durante el cierre de cadenas en la terminación del proceso conjugativo. Los análisis de la interacción entre TrwC y el DNA superenrollado (Guasch *et al.*, 2003) o DNA monocatenario (González-Pérez *et al.*, 2007) han puesto de manifiesto que la formación de una horquilla con la secuencia de la IR₂ (localizado a 5' del sitio de corte) sólo tiene lugar en la terminación (ver Fig. 8). Por otro lado, se ha observado que un cambio puntual (C por G) en la secuencia del *oriT* de R388 supone la pérdida de capacidad de corte de TrwC y se ha conseguido variar la especificidad de corte de TrwC mediante diseño racional, cambiando la Lys262 de TrwC por otros residuos como Ala (González-Pérez *et al.*, 2009).

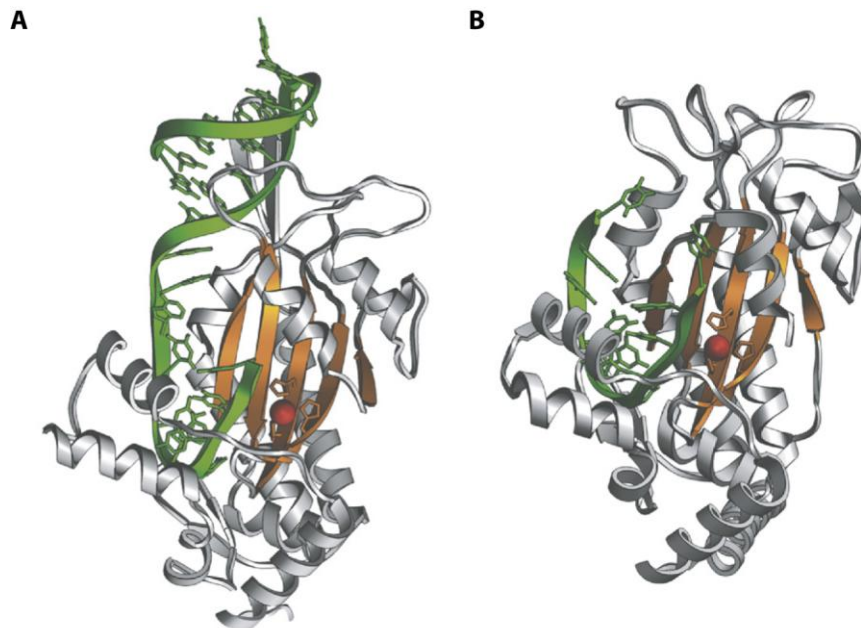


Figura 11. Estructuras del dominio relaxasa de las proteínas TrwC (A) y Tral (B).

La lámina- β central formada por cinco cadenas antiparalelas se muestra en color naranja. La esfera roja indica la posición del átomo de metal coordinado por tres histidinas del centro activo. En verde se representa la cadena de DNA de 27 o 10 bases empleadas en la obtención de los co-cristales de TrwC y Tral, respectivamente. Modificado de Gomis-Rüth & Coll, 2006.

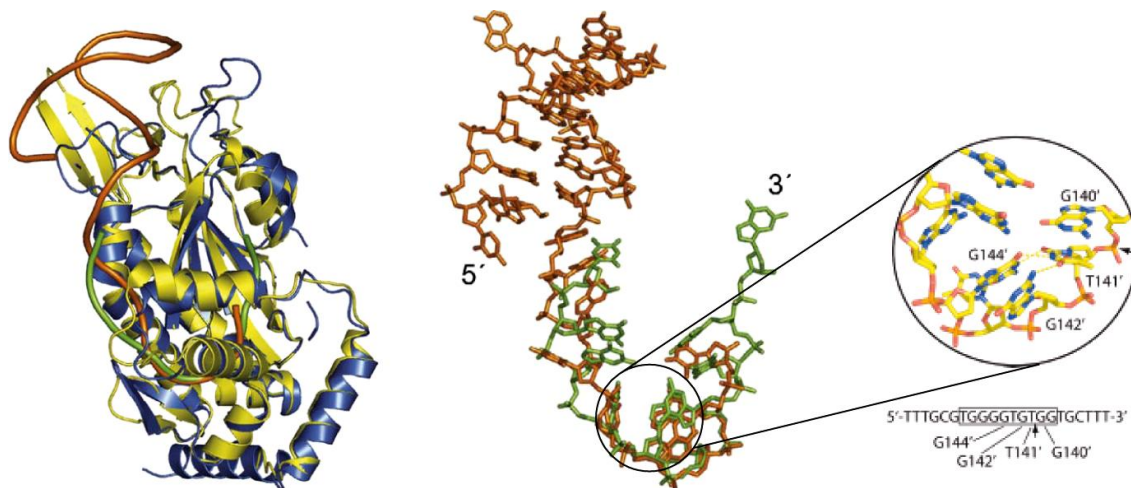


Figura 12. Estructura del *oriT* en estado monocatenario tras la unión a TrwC o Tral.

A la izquierda se representan las estructuras definidas para TrwC (en amarillo) y Tral (azul) con oligonucleótidos de 27 (marrón) o 22 (verde) bases, respectivamente. En el centro, se muestran las conformaciones de ambos DNAs. Mientras que el DNA empleado para TrwC incluye una IR en el extremo 5' y acaba justo en la base anterior al sitio de corte, el DNA de Tral no incluye el IR pero se extiende 8 bases después del sitio de corte. A la derecha se indican las interacciones intramoleculares observadas en el cristal de Tral con el DNA. La flecha indica la posición del sitio de corte. Modificado de Larkin *et al.*, 2005 y Hekman *et al.*, 2008.

2.3.2. Familia MOB_H

La relaxasa prototipo es la proteína Tral del plásmido R27 (*Salmonella typhi*), la cual presenta una variante del motivo 3-H (H/Q-x₂-PASE-x-HHH-x₃-GG-x₃-H-x-L) y un nuevo motivo hidrolasa HD (L/V-x-HD-A/V/L/I-GK), específica de esta familia. Las proteínas con un motivo de este tipo presentan actividad fosfohidrolasa dependiente de catión (Aravind & Koonin, 1999). Ello supondría que las relaxasas MOB_H disponen de dos alternativas para la coordinación de metal, aunque esta hipótesis aún no se ha demostrado. Dentro de esta familia se han propuesto varios residuos Y catalíticos que todavía no se han analizado por mutagénesis (Sherburne *et al.*, 2000). El *oriT* de R27 está localizado una región intergénica de 757 pb, entre los genes *orf122* y *orf123* (Sherburne *et al.*, 2000). Dentro de esta región se ha acotado una subregión de 285 pb (Fig. 13) que constituye el *oriT* mínimo para la movilización del plásmido y que incluye ocho DR de 7 a 9 pb (Lawley *et al.*, 2002).

2.3.3. Familia MOB_C

En las relaxasas de esta familia no se ha observado conservación en el motivo catalítico o de coordinación de metal, lo cual parece indicar que no tienen relación con las relaxasas de las cinco familias restantes. En la proteína TraX del plásmido pAD1 (*E. faecalis*) se ha demostrado que los residuos que componen la única región que se conserva en esta familia (D-x₆₋₁₇-E-x-E-R/L-x₂-K-x₃-R-Y/F) son esenciales para la actividad de transferencia (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). La tirosina catalítica sería Y181, y el motivo de coordinación de metal estaría compuesto por los residuos D152, E170 y E172. Otra característica única de esta familia se ha observado en la relaxasa MobC del plásmido CloDF13 (*Enterobacter cloacae*), donde tras la reacción de corte no existe una unión covalente con el extremo 5' del DNA (Núñez & de la Cruz, 2001). En cuanto al *oriT* se ha observado cierta similitud de secuencia en la región cercana al sitio *nic* de los plásmidos CloDF13, pAD1 y pAM373, el cual estaría localizado en el tallo de una IR de 140 pb, junto a una serie de DRs cortas que han sido propuestas como sitios de unión para las respectivas relaxasas. Ninguno de ellos guarda similitud con los *oriTs* de otros grupos de plásmidos descritos (Francia & Clewell, 2002; Francia *et al.*, 2004).

2.3.4. Familia MOB_Q

Las relaxasas de tipo MOB_Q, representada por la proteína MobA de los plásmidos movilizables RSF1010 y R1162 (ambos de *E. coli*), poseen dos dominios

(Parker & Meyer, 2005a). Aparte de la actividad relaxasa, que se encuentra en el dominio N-terminal, se ha descrito que el dominio C-terminal presenta actividad primasa, esencial en replicación vegetativa. Además, la fusión de estos dominios supone una adaptación evolutiva que, durante la transferencia plasmídica, permite la iniciación de la síntesis de la cadena complementaria de DNA en la célula receptora de forma eficiente (Parker *et al.*, 2005b). En el año 2007 se publicó la estructura del fragmento relaxasa de MobA, denominado minMobA (Monzingo *et al.*, 2007). Aunque la homología entre las secuencias de TrwC y MobA es menor del 15%, ambas proteínas presentan una estructura tridimensional y una distribución de residuos en el centro activo muy similares. La diferencia más notable es que en la posición equivalente al residuo D85 de TrwC, en MobA se encuentra un glutámico (E74) que no es esencial para su actividad. Otra proteína de la familia es la relaxasa TraA del plásmido pIP501 (*Streptococcus agalactiae*). Tanto la proteína nativa (600 residuos) como una versión truncada con el extremo N-terminal (293 residuos) presentan actividad relaxasa sobre un DNA superenrollado que contiene el *oriT* de pIP501 (Kopek *et al.*, 2005). Esta actividad es óptima a temperaturas entre 42 y 45°C, y además es dependiente de iones Mn^{2+} o Mg^{2+} .

Los *oriTs* de plásmidos tipo MOB_Q contienen una IR imperfecta de 10 pb y una región adyacente rica en AT, próxima al sitio de corte (Derbyshire *et al.*, 1987). Se ha demostrado que tanto la repetición invertida como la secuencia "TAA" adyacente al brazo proximal son esenciales para la unión de la relaxasa (Becker & Meyer, 2000). Además, mientras que el brazo distal de la IR no se necesita para la iniciación, es esencial para una terminación eficiente después de la transferencia (Bhattacharjee *et al.*, 1992). También se ha observado que aunque existe una alta variabilidad en la secuencia del IR de los plásmidos de la familia, no hay una gran especificidad de unión de la relaxasa (Becker & Meyer, 2003).

2.3.5. Familia MOB_P

La proteína Tral del plásmido conjugativo RP4 (*Pseudomonas aeruginosa*) es la relaxasa prototipo de esta familia. El dominio relaxasa se localiza en la región N-terminal mientras que el dominio C-terminal, además de contener los motivos de dimerización, está implicado en las interacciones con otros componentes de la maquinaria de transferencia. Los motivos conservados son muy similares a los que presentan las relaxasas de las familias MOB_F y MOB_Q . El motivo de coordinación de metal conservado es H-x-D/E-T-D/E-x₂-H-x-Hx₃-N-x₃-P. El residuo E80 de Tral_RP4

podría tener el mismo papel que el residuo D85 de TrwC, aunque aún no se ha demostrado. Aunque hay residuos esenciales en cada uno de los motivos conservados (Y22, S74 and H116), de forma sorprendente, los residuos H109 o H118 del motivo 3-H parecen ser prescindibles (Pansegrau *et al.*, 1994). El residuo Y22 es la única tirosina que se conserva y está implicada en el ataque nucleofílico que posibilita el corte del DNA en presencia de iones Mg^{2+} (Pansegrau *et al.*, 1990). TraI_{RP4} también realiza la transferencia de cadenas durante la terminación de la transferencia conjugativa del DNA (Pansegrau *et al.*, 1993). Así, la Y22 de uno de los monómeros sería responsable de la reacción de corte en el inicio de la transferencia, mientras que el mismo residuo del otro monómero realizaría el segundo corte en el sitio *nic* en la terminación (Pansegrau & Lanka, 1996b). Dentro de este grupo se encuentra una subfamilia denominada MOB_{HEN}, representada por la relaxasa MbeA del plásmido movilizable ColE1 de *E. coli*, la cual presenta una variante del motivo de coordinación de metal denominado motivo HEN. De hecho, la sustitución de los residuos E104 y N106 de MbeA por histidinas no tuvo consecuencias en la actividad relaxasa (Varsaki *et al.*, 2003). Sin embargo, el cambio de los residuos Y19, H97, E104 y N106 por alaninas supuso la pérdida de la función relaxasa. Este trabajo también demostró que la temperatura óptima para la actividad catalítica es a 45°C y que los cationes divalentes adecuados son Mg^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} .

El *oriT* del plásmido RP4 se localiza dentro de una región 350 pb que contiene varias IRs y DRs (Fürste *et al.*, 1989). A 5' del sitio de corte se encuentra una IR cuyo brazo proximal es suficiente para la formación del relaxosoma y la reacción de iniciación. No ocurre así en la terminación, para la que se necesita todo el IR. El *oriT* de R64 tiene dos IRs a 5' del sitio de corte y abarca una región de 94 pb. La secuencia mínima para el inicio de la transferencia es de 44 pb, e incluye el brazo proximal de la IR más cercana al sitio de corte (Furuya & Komano, 1997), mientras que para la terminación se requieren los dos IRs (Furuya & Komano, 2000). El plásmido R6K presenta dos *oriTs* denominados α y β (Avila *et al.*, 1996; Flashner *et al.*, 1996). Ambos son funcionales al mismo nivel y contienen secuencias palindrómicas flanqueadas por regiones con alto contenido AT. El sitio de corte se localiza dentro de una secuencia de 17 pb, conservada en los dos orígenes. El *oriT* de ColE1, perteneciente a la subfamilia MOB_{HEN}, se ha definido en una región de 100 pb en base a la similitud de secuencia con plásmidos homólogos. Este fragmento incluye una IR distanciada 30 pb a 5' del sitio de corte (Francia *et al.*, 2004).



Figura 13. Orígenes de transferencia.

Se indica la secuencia de los plásmidos prototipo de cada una de las familias MOB, a excepción del *oriT* de pMV158 (ver más abajo), en sentido 5'-3'. Las flechas indican la posición de las repeticiones invertidas (IR), o bien la ubicación de las repeticiones directas en el caso del plásmido R27. Las discontinuidades reflejan las zonas desapareadas en las posibles estructuras secundarias formadas por cada IR. " / " indica el sitio de corte mapeado experimentalmente (nótese que en R27 aún no ha sido definido). La G subrayada en RSF1010 es la única diferencia de secuencia respecto al plásmido R1162 (que contiene una A). N, cualquier nucleótido.

2.3.6. Familia MOB_V

Esta superfamilia se divide en varios subgrupos dependiendo de la conservación de los dominios encontrados (Francia *et al.*, 2004; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). MOB_{V1}, representado por MobM de pMV158, presenta tres motivos: el motivo I (H-x₂-R), de función desconocida; el motivo II (N-Y-(D/E)-L), con la presunta Tyr catalítica; y el motivo III o 3-H (H-x-D-E...P-h-x-h), implicado en la coordinación de un metal divalente. MOB_{V2}, representado por la proteína Mob del plásmido movilizable pBBR1 (*Bordetella bronchiseptica*), carece del motivo II y solo presenta el motivo I y una variante del motivo 3-H, con una secuencia consenso en la que la tercera histidina puede variar (H-x-D-Ex₂-P-H-x-(H/S/T)) (Szpirer *et al.*, 2001). En la subfamilia MOB_{V3} se encuentra el transposón Tn5520 (*Bacteroides fragilis*), en el que se ha observado que la proteína BmpH tiene actividad relaxasa (Vedantam *et al.*, 2006). BmpH no tiene el motivo II y presenta una variante del motivo I, con una isoleucina en el lugar de la histidina (I-x₂-R; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). La proteína MobA del transposón

Tn4555 (Smith & Parker, 1998), representante de las relaxasas de tipo MOB_{V4}, tampoco presenta el motivo II.

Los plásmidos de esta familia presentan una configuración similar en sus *oriT*s. Sin embargo, a diferencia de pBBR1, el sitio *nic* de pMV158 se encuentra en el bucle de una de sus dos IRs (con brazos de 7 y 9 pb y bucles de 4 y 6 bases, respectivamente). En pBBR1 se ha definido una región de 52 pb en la que el sitio *nic* se encuentra en una secuencia de 4 pb, flanqueada por dos IR de 29 pb y 15 pb, respectivamente (Fig. 13; Szpirer et al., 2001). El *oriT* mínimo de Tn5520 contiene una repetición invertida de 17 pb y una mutación en el dinucleótido de corte (5'-GpC-3') anula su capacidad de movilización (Vedantam et al., 2006). Tanto la proteína MobM como el *oriT* de pMV158 han sido el objeto de estudio de esta tesis. Por ello, dedicaremos el siguiente apartado a la presentación de los resultados obtenidos en este sistema hasta el momento de iniciar nuestro trabajo experimental.

3. EL PLÁSMIDO pMV158

El plásmido pMV158 (5540 pb), aislado originalmente de la estirpe *Streptococcus agalactiae* MV158 (Burdett, 1980), ha sido estudiado en nuestro laboratorio durante más de veinte años. Es el prototipo de una familia de plásmidos de replicación RC compuesta por más de 40 miembros aislados de distintas bacterias (Espinosa, *en preparación*). Como muchos plásmidos aislados de bacterias G+ y G-, pMV158 es capaz de colonizar diversas especies, tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *E. coli*, entre otras. Se ha demostrado que pMV158 es movilizado mediante funciones aportadas por plásmidos auxiliares (como pIP501), entre diferentes estirpes de *S. pneumoniae*, o hacia otras especies como *E. faecalis* y *L. lactis* (Smith *et al.*, 1980; Nieto & Espinosa, 2003; Farías & Espinosa, 2000; Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009b).

La organización genética que presenta pMV158 ha permitido definir distintos módulos (Fig. 14): 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 resistencia al antibiótico tetraciclina; iii) el módulo MOB, que codifica las funciones de movilización conjugativa, y iv) dos orígenes de cadena retrasada, *ssu*. Algunos de los plásmidos de la familia de pMV158

pueden carecer de uno o más de estos módulos, aunque el módulo LIC es esencial (del Solar *et al.*, 1993).

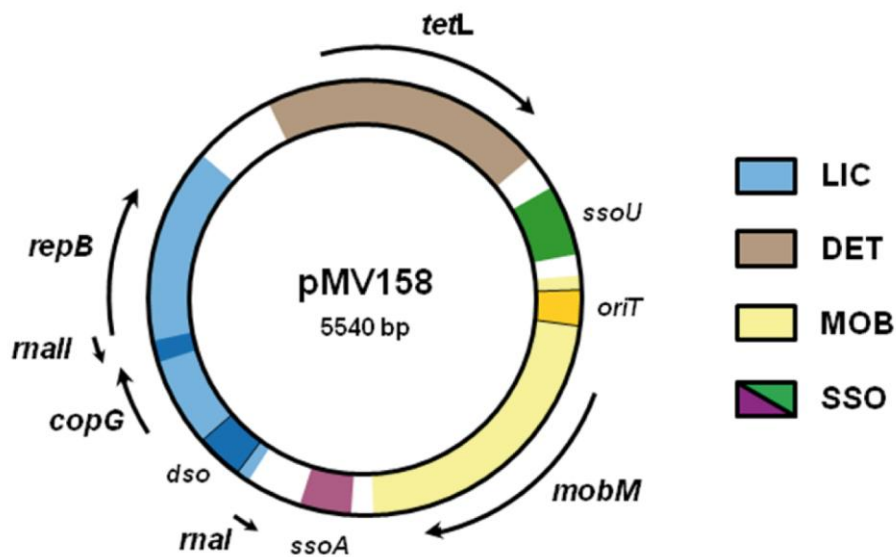


Figura 14. Mapa genético y funcional del plásmido pMV158.

En la figura se muestran los seis genes identificados y que se transcriben en el plásmido, dos de los cuales codifican RNAs (RNA I y RNA II); *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 (*ssoA* y *ssoU*), a partir de los que se produce la replicación de la cadena líder y retrasada de pMV158, respectivamente.

3.1. El módulo LIC

El módulo LIC de pMV158 ha sido estudiado exhaustivamente. Comprende una región de 1.15 Kb y, además del origen de replicación de doble cadena (*dso*), incluye tres de los seis genes identificados en el plásmido. Concretamente, el promotor P_{cr} dirige la síntesis de un mRNA bicistrónico, correspondiente a los genes *copG* y *repB* (138 y 537 pb, respectivamente) y el promotor P_{cII} dirige la transcripción de un RNA de pequeño tamaño denominado RNAII.

La proteína RepB (210 aminoácidos; 24252 Da) inicia la replicación por círculo rodante mediante reconocimiento del *dso* y corte específico en una de las cadenas del DNA. El *dso* contiene dos regiones de unión, una proximal en la que se encuentra el sitio de corte, y otra distal separada a 84 pb del mismo (Ruiz-Masó *et al.*, 2007). Tras la unión de RepB a la región distal, por la que presenta mayor afinidad, se genera una distorsión y doblamiento local del DNA que favorece la extrusión de la horquilla que

contiene el sitio de corte en la región proximal (Fig. 15C; Ruiz-Masó *et al.*, 2007). RepB se purifica como un hexámero (Ruiz-Masó *et al.*, 2004) y, según ha revelado su estructura atómica cristalina, presenta dos dominios claramente diferenciados (Boer *et al.*, 2009). El dominio N-terminal endonucleolítico, formado por la alternancia de cadenas- β y hélices- α , presenta un centro activo compuesto por el residuo catalítico Tyr99, y un catión Mn^{2+} coordinado por los residuos His39, His55, His57, y Asp42, además de por el átomo de oxígeno de una molécula de agua. El dominio C-terminal está constituido por hélices- α y está implicado en la hexamerización de la proteína. Ambos dominios están separados por una región bisagra que permite cierta movilidad (Fig. 15).

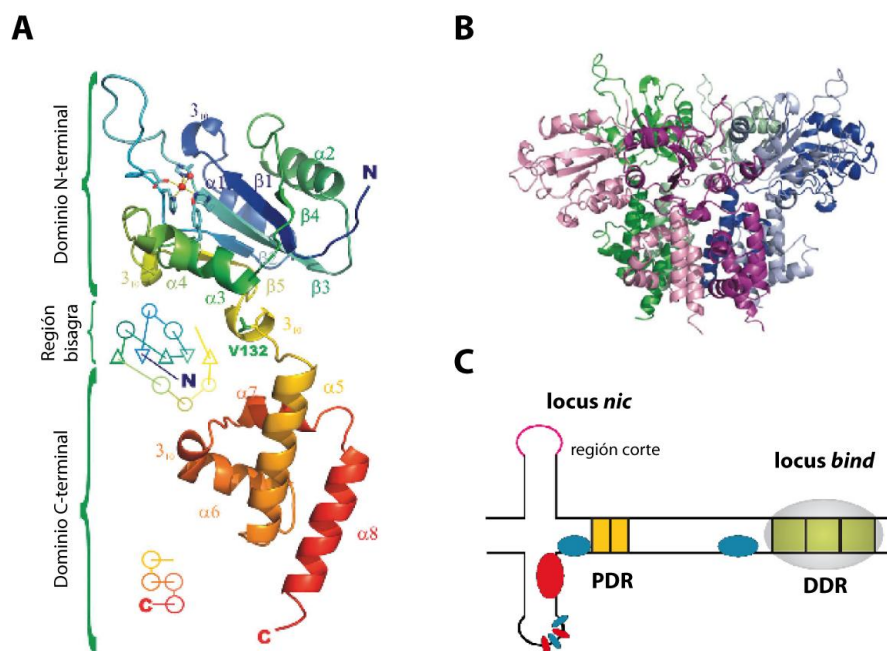


Figura 15. Estructura tridimensional de RepB e interacciones con el *dso*.

A) Monómero de RepB indicando la topología y los elementos de estructura secundaria de los dominios de oligomerización y de unión al DNA. **B)** Representación del hexámero de RepB, mostrando cada uno de los protómeros en un color diferente. **C)** Esquema del *dso*, indicando la posición de las repeticiones directas distales (DDR) o proximales (PDR) al sitio de corte. La unión de RepB al locus *bind* y, posteriormente al locus *nic*, provoca la distorsión del DNA en las regiones indicadas mediante óvalos azules (sensibilidad a $KMnO_4$) o rojos (sensibilidad a DMS), según se ha observado mediante *footprinting* sobre DNA superenrollado. Modificado de Ruiz-Masó *et al.*, 2007 y Boer *et al.*, 2009.

La proteína CopG (45 aminoácidos; 5.1 kDa) y el RNA II (48 bases) están implicados en el circuito de control de la replicación del plásmido a nivel transcripcional y traduccional, respectivamente. CopG se comporta como un homodímero en solución y pertenece a la superfamilia de represores con dominio “ribbon-helix-helix” (Gomis-

Rüth *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2001). 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 P_{cr} o bien puede desplazarla una vez que se haya unido (Hernández-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). Por otro lado, se sabe que el RNA II regula la síntesis de la proteína RepB probablemente mediante anillamiento complementario con una región del mRNA-*cop-rep* que contiene el posible sitio de unión de los ribosomas del gen *repB*. Así, la actuación conjunta del RNA II con la proteína CopG permite una regulación muy fina del control en el número de copias del plásmido (Fig. 16).

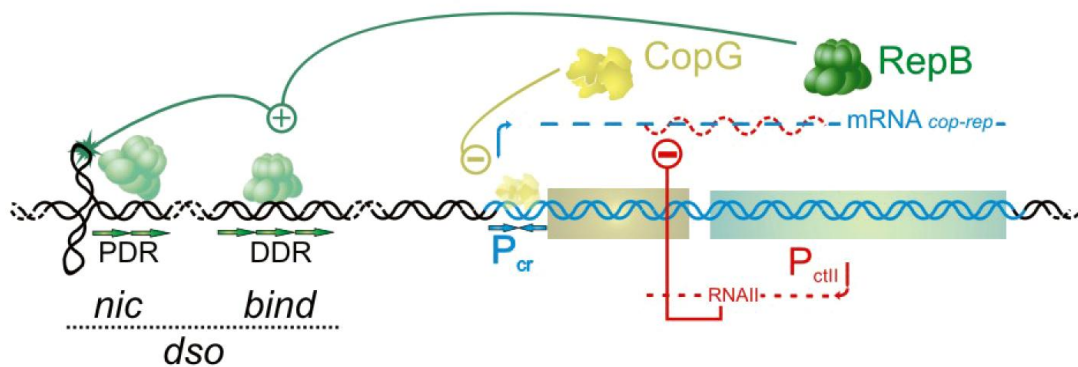


Figura 16. Circuito de control del número de copias de pMV158.

Los elementos positivos (+) son la proteína iniciadora de la replicación, RepB (en verde), y su DNA diana, el origen de replicación (*dso*). Los elementos negativos (-) son la proteína CopG (en amarillo) y el RNAII (en rojo). En el mismo mRNA, se transcriben CopG y RepB. CopG se une a su DNA diana, y reprime la transcripción de P_{cr} , inhibiendo su propia síntesis y también la de RepB. El RNA II es complementario al sitio de unión del ribosoma para la síntesis de RepB, y actúa como otro elemento regulador negativo, en este caso a nivel traduccional. No parece existir jerarquía en ambos elementos reguladores.

3.2. El módulo DET

El plásmido pMV158 es portador de un gen del tipo *tetL* (1377 pb), determinante de resistencia a tetraciclina (Burdett, 1980). Este antibiótico accede al interior celular y se une a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, bloqueando la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor (A) del complejo formado por el mRNA y la subunidad 50S del ribosoma. De esta forma, la síntesis de proteínas se encuentra bloqueada al impedir la adición de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento. El mecanismo de resistencia se basa en el bombeo del antibiótico hacia el

exterior de la célula mediante la proteína de membrana Tet(L) (458 aminoácidos; 50 KDa). Un gen homólogo al de pMV158 se encuentra en el plásmido de estafilococos pT181 (Khan & Novick, 1983), así como en el cromosoma de *B. subtilis* 168 (resultados de nuestro laboratorio).

3.3. El módulo MOB

El módulo MOB (1.65 kb) contiene dos elementos implicados en la transferencia conjugativa del plásmido pMV158: el origen de transferencia (*oriT*) y el gen *mobM* (Priebe & Lacks, 1989). El producto de este gen (1485 pb) es la proteína MobM (494 residuos aminoacídicos; 57869.4 Da) y, como se ha comentado anteriormente, es la relaxasa prototipo de una familia compuesta por casi 100 miembros (Francia *et al.*, 2004; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009).

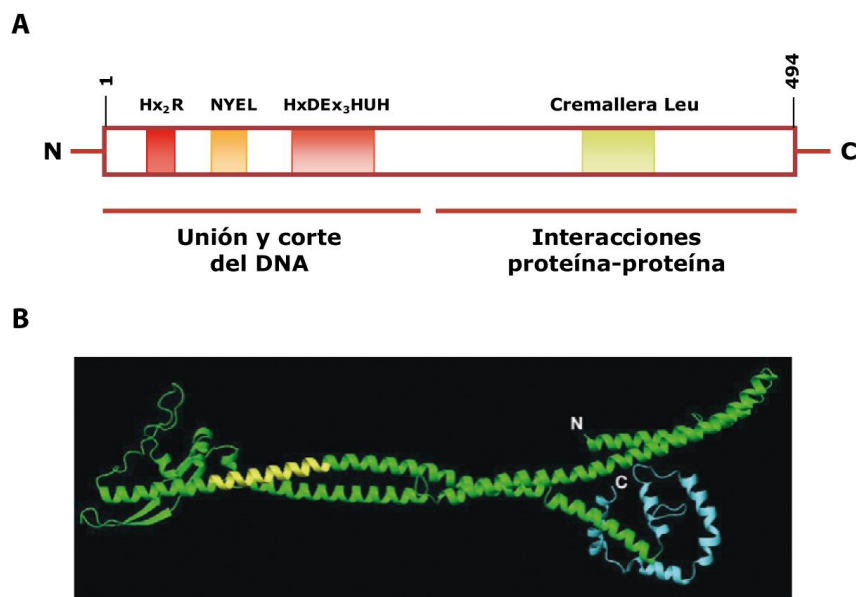


Figura 17. La proteína MobM.

A) Esquema de los dominios de la proteína, indicando cada uno de los motivos conservados. **B)** Predicción de la estructura terciaria de la región C-terminal de MobM en base a homología con la proteína Colicina IA. El dominio que contiene la cremallera de Leu se muestra en amarillo y el dominio de asociación a membrana en azul. Tomado de: de Antonio *et al.*, 2004.

MobM presenta dos dominios (Fig. 17A): i) En la región N-terminal se localiza el dominio de unión y corte de DNA (dominio relaxasa); y ii) en la región C-terminal se ubica el dominio putativo de dimerización, probablemente mediado por una cremallera de leucinas (LENHSKSLEAKIECLESDNLQL) situada entre los residuos 317 y 338 (Grohmann *et al.*, 2003). Además de que este dominio también debe actuar en la

interacción con otras proteínas, la región próxima al extremo C-terminal está implicada en asociación a la membrana plasmática, según se ha observado al interrumpir esa zona mediante la sustitución de ciertos residuos por prolina a partir del residuo 400 (de Antonio *et al.*, 2004). Mediante análisis bioquímicos se ha demostrado que la proteína MobM es un dímero con forma elipsoide a una concentración de 2 μ M. Además, el porcentaje de estructura secundaria se ha estimado en un 60% de contenido en hélice- α , un 5% de lámina- β y un 35% de estructuras desordenadas. Los espectros de emisión de fluorescencia han mostrado una elevada contribución de los 3 triptófanos frente a la obtenida para las 15 tirosinas que posee, así como un máximo de emisión para los Trp indicativo de que se encuentran en un entorno relativamente hidrófobo. La homología con una región de la proteína Colicina IA de *E. coli* (implicada en la formación de canales iónicos) ha permitido un modelado sobre una parte de la proteína MobM, comprendida entre los residuos 54 y 483 (de Antonio *et al.*, 2004; Fig. 17B).

Se ha descrito que el *oriT* de pMV158 presenta dos repeticiones invertidas (IR1 y IR2) de 18 y 24 pb, respectivamente (Fig. 18C; Guzmán & Espinosa, 1997). MobM protege la región comprendida entre el brazo izquierdo y derecho de IR2 en un DNA bicatenario lineal que contiene el *oriT*, según se ha observado mediante *footprinting* con DNasa I (Fig. 18A; Grohmann *et al.*, 1999). Sin embargo, tanto la región que incluye el brazo izquierdo de IR1 (IR1-L en la Fig. 18C) como el sitio de corte permanecen desprotegidos en esas condiciones. MobM ejerce un ataque nucleofílico sobre una de las cadenas del *oriT* de pMV158 (5'-GTGTG/T-3'; donde "/" indica el sitio de corte), y permanece unida de forma estable al extremo 5' (Fig. 18B; Guzmán & Espinosa, 1997). 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). Así, MobM es capaz de cortar tanto DNA superenrollado de pMV158, como un oligonucleótido que incluye la secuencia del *oriT*. Sin embargo, MobM no presenta actividad catalítica sobre DNA bicatenario lineal. Los datos presentados en la Figura 19 demuestran 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 (>25 min). A su vez, se ha demostrado que la proteína es parcialmente activa mediante coordinación de iones Ca²⁺, pero no es funcional en presencia de Ba²⁺ o Zn²⁺, y que el pH óptimo es 7.6 (de Antonio *et al.*, 2004).

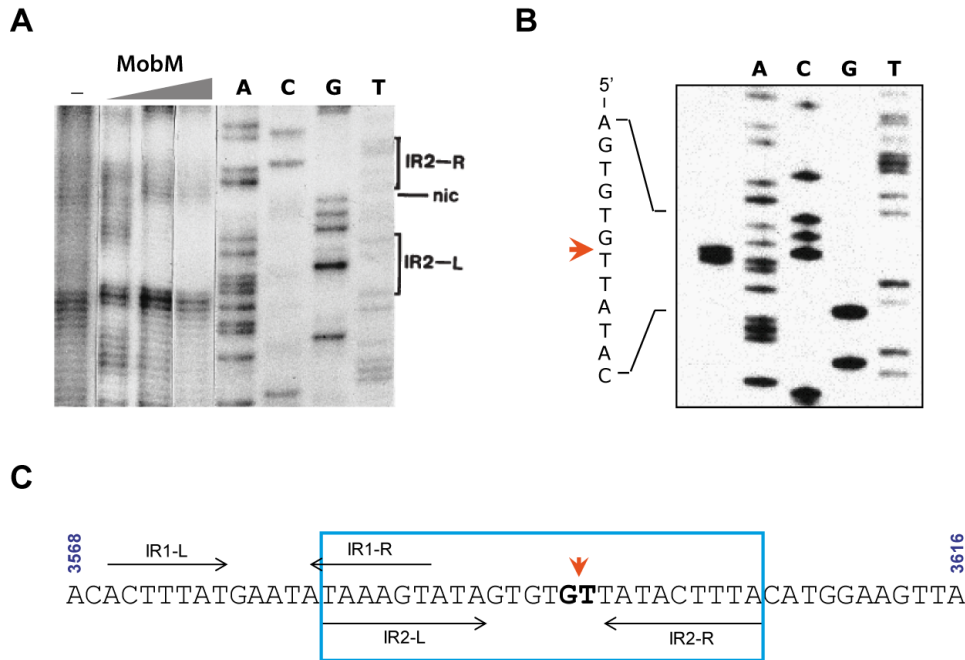


Figura 18. Interacciones entre MobM y el *oriT*.

A) *Footprinting* con DNase I sobre DNA bicatenario lineal, indicando las zonas protegidas del *oriT* tras la unión de MobM. **B)** Definición del sitio de corte específico introducido por MobM dentro de la secuencia del *oriT* de pMV158. **C)** Secuencia del *oriT* en la cadena de DNA transferente de pMV158, mostrando las dos repeticiones invertidas y la posición del sitio de corte. El recuadro azul muestra la región contactada por MobM según los resultados mostrados en el panel A. Modificado de Guzmán & Espinosa, 1997 y Grohmann *et al.*, 1999.

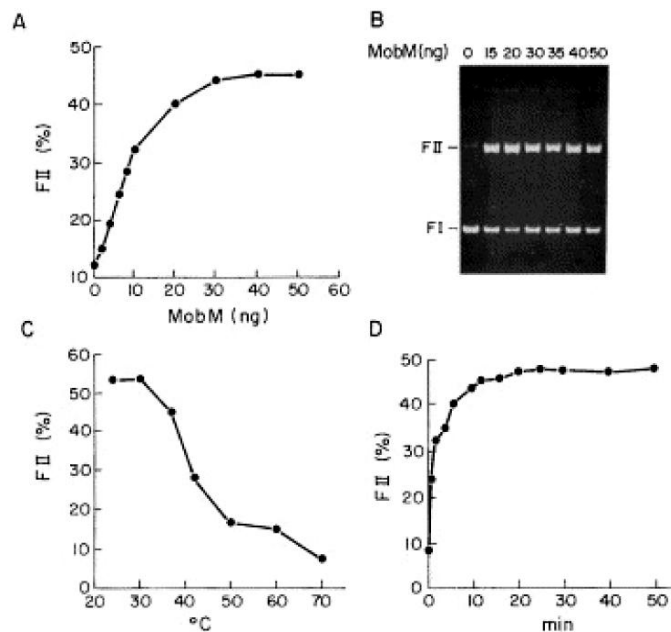


Figura 19. Actividad relaxasa de MobM.

La capacidad de MobM para convertir formas superenrolladas del plásmido pMV158 (FI en panel B) en formas relajadas (FII) en presencia de catión (Mn^{2+} o Mg^{2+}), dependen de la concentración de proteína (A), y de la temperatura (C) y tiempo de incubación (D) de la reacción. Tomado de Guzmán & Espinosa, 1997.

3.4. Orígenes de cadena retrasada (sso)

La replicación de pMV158 se caracteriza por la generación de intermediarios de DNA de cadena sencilla (ssDNA). Estas moléculas actúan de molde para la nueva síntesis de la cadena complementaria y reconstituir así el plásmido a su forma bicatenaria (dsDNA). La eficiencia de este proceso depende de la combinación plásmido-huésped. La conversión del ssDNA en dsDNA se inicia por la RNAP del huésped a partir del origen de replicación de cadena retrasada, *sso* (*single strand origin*). Los *sso* son secuencias palindrómicas ubicadas en regiones no codificantes del plásmido y con capacidad para formar estructuras secundarias de tipo tallo-lazo en moléculas de ssDNA, intermedios de la replicación RC. El primer *sso* se identificó en el plásmido pT181 (*Staphylococcus aureus*) tras observar que la delección de una región distante al módulo de replicación suponía inestabilidad plasmídica, el número de copias disminuía, y se acumulaban cantidades significativas de ssDNA (Gruss *et al.*, 1987).

De los cuatro tipos de *sso* que se han descrito hasta la fecha en plásmidos RC (*ssoA*, *ssoT*, *ssoU* y *ssoW*), el plásmido pMV158 posee *ssoA* y *ssoU* (Fig. 20). Mientras que el *ssoA* y *ssoW* solo actúan eficientemente en sus huéspedes originales *in vivo*, el *ssoU* y *ssoT* son funcionales en un amplio rango de especies bacterianas. En este tipo de orígenes de replicación existen dos elementos relativamente conservados: la secuencia RS_B (*recombination site B*) y la secuencia CS-6 (*conserved 6-nt sequence*). Se ha demostrado que RS_B se comporta como un pseudo-promotor bicatenario en el ssDNA, al cual se une la RNA polimerasa, iniciando la síntesis de un cebador de RNA (pRNA) (Kramer *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1999). La secuencia CS-6 actúa como terminador transcripcional y señal de relevo de la RNAP por la DNA polimerasa I (Poll), de forma que el pRNA sirve de cebador para iniciar la síntesis de un fragmento del DNA de la cadena complementaria. A continuación, la DNA PolIII continua la síntesis de la cadena retrasada a partir del oligonucleótido generado por la Poll, hasta completar el proceso replicativo (Fig. 20).

OBJETIVOS

Los plásmidos movilizables de bacterias G+ están poco caracterizados a pesar de su importante papel en la transferencia horizontal de DNA entre distintas bacterias. Por ello, y dada su capacidad para establecerse y replicar de forma estable en diversos huéspedes, pMV158 es un sistema interesante para el estudio de las interacciones macromoleculares que tienen lugar durante la conjugación. En la presente Tesis Doctoral hemos planteado una serie de objetivos que encuadramos en una estructura que parece lógica, siguiendo algunas de las etapas importantes en el proceso de transferencia conjugativa del plásmido en estudio, según se muestra en la Figura 21. Estos objetivos son:

- 1. Análisis transcripcional del gen *mobM*.** El promotor de *mobM* está localizado en la misma región que incluye el origen de transferencia, la diana de MobM. Así, la definición del punto de iniciación de la transcripción de este gen es un aspecto esencial para formular un modelo de mecanismo de la auto-regulación de MobM a nivel transcripcional.
- 2. Caracterización del dominio relaxasa de MobM.** La definición y purificación del dominio de unión y corte de DNA de la proteína MobM es importante para realizar una caracterización en profundidad de algunas de sus propiedades espectroscópicas e hidrodinámicas, además de realizar estudios de termodinámica e interacción con diferentes metales divalentes, esenciales para su actividad biológica.
- 3. Estudio de las interacciones entre MobM y su DNA diana.** El análisis detallado de los contactos de MobM con el origen de transferencia (*oriT*) incluye el empleo de sustratos de DNA que difieran en su topología: DNA superenrollado (Fig. 21, etapa 3a) o monocatenario (Fig. 21, 3b). Ello permitirá la definición de la secuencia mínima de reconocimiento, así como los requerimientos estructurales del *oriT* para una actividad catalítica eficiente de MobM. A su vez, la estructura tridimensional de los complejos proteína:DNA mediante cristalografía de rayos X será fundamental para conocer dichas interacciones.
- 4. Determinación del papel de los orígenes de cadena retrasada (*ssb*) en la transferencia.** En la conjugación se transfiere DNA monocatenario en sentido 5'→3'. Por tanto, alguno de los dos *ssb* de pMV158 (o ambos) podría(n) estar implicado(s) en la reconstrucción de la doble cadena del DNA en la célula receptora. Para abordar este asunto, se introducirán mutaciones que anulan la

funcionalidad de uno o ambos *ssd* de pMV158, y se diseñará un protocolo de conjugación en placas multipocillo, que permita un análisis comparativo de las eficiencias de transferencia, número de copias y acumulación de ssDNA de estos mutantes con respecto al plásmido silvestre.

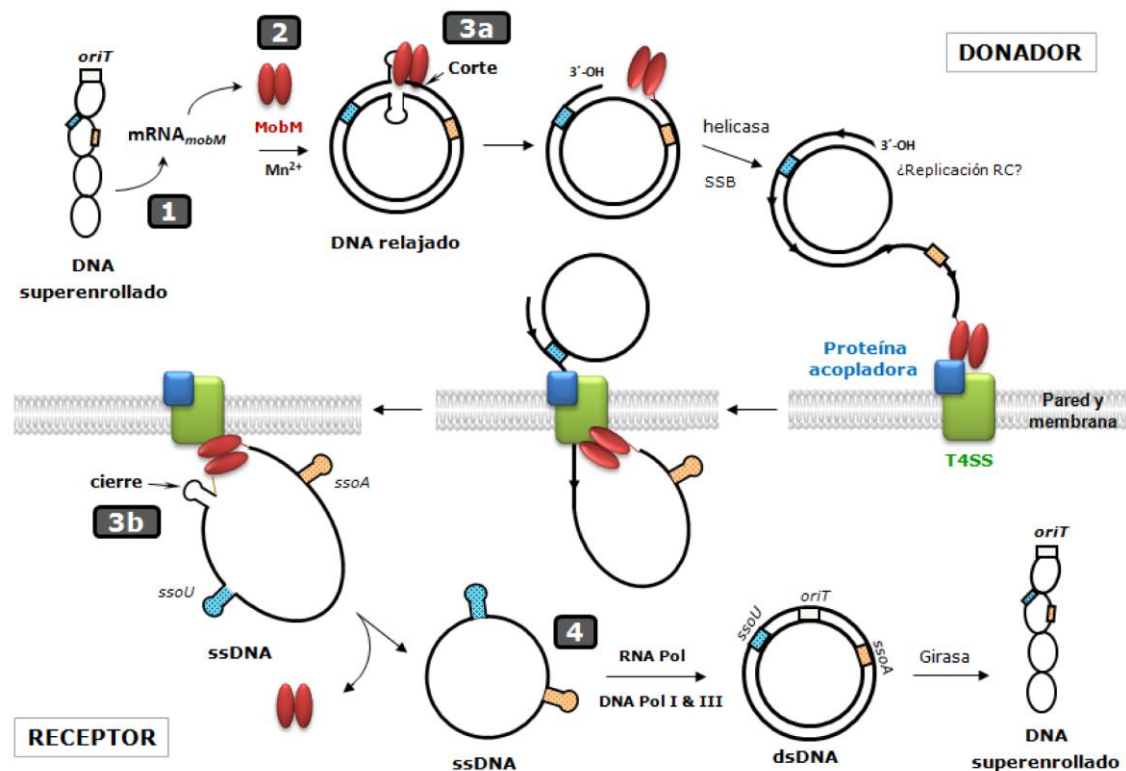


Figura 21. Modelo de transferencia del plásmido pMV158 por conjugación.

La transcripción del gen *mobM* (1) y su traducción, genera una proteína con actividad relaxasa denominada MobM (2). En presencia de cationes divalentes, MobM reconoce el DNA superenrollado, corta en el origen de transferencia (*oriT*) y queda unida al extremo 5' de la cadena transferente (3a). El DNA queda relajado y listo para iniciar la transferencia hacia la célula receptora con ayuda de proteínas auxiliares aportadas por el huésped (helicasa, proteína de unión a DNA monocatenario, SSB) y por un elemento conjugativo (proteína acopladora y sistema de secreción de tipo 4, T4SS). Ya en la célula receptora, MobM debe reconocer el sustrato de DNA monocatenario y cerrarlo nuevamente (3b). La conversión ssDNA a dsDNA podría iniciarse por la RNA polimerasa en *ssdA* y/o en *ssdU* (4). Por último, el DNA bicatenario reconstituido es superenrollado por la girasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. ESTIRPES BACTERIANAS

Tabla 2. Estirpes bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo ^a	Fuente
<i>S. pneumoniae</i> 708	<i>end-1, exo-1, trt-1, hex-4, malM594</i>	(Lacks & Greenberg, 1977)
<i>S. pneumoniae</i> MP517	<i>end-1, exo-1, trt-1, hex-4, malM594; Nov^R</i>	Colección del laboratorio
<i>S. pneumoniae</i> MP3008	<i>end-1, exo-1, trt-1, hex-4; Nov^R</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 Δ (lac-proAB) relA1 (F' traD36 proAB⁺ lacI^qZΔM15) λ⁻</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>λ DE3 (lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5) F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁺) gal</i>	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> B834(DE3)	<i>λ DE3 (lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5) F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁺) gal met</i>	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>E. faecalis</i> OG1RF	Gel ⁺ , Spr ⁺ (gelatinasa y serina proteasa); Rif ^R	(Murray <i>et al.</i> , 1993)

^aNov^R, Rif^R: resistencia a novobiocina y rifampicina, respectivamente.

2. MEDIOS DE CULTIVO Y SELECCIÓN

El medio de cultivo empleado para *S. pneumoniae* fue AGCH (Lacks *et al.*, 1986) complementado con 0,2% de extracto de levadura y 0,3% de sacarosa o maltosa, dependiendo de la estirpe. Para el crecimiento en medio sólido, la siembra y la preparación de la placa se realizó de forma simultánea (ver apartado 1 de Métodos) empleando el mismo medio que para cultivos líquidos. La selección por resistencia a los diferentes antibióticos fue: 1 µg/ml de eritromicina (Em), 1 µg/ml de tetraciclina (Tc), 10 µg/ml de novobiocina (Nov). Para el crecimiento de *E. coli* se empleó el medio TY (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%). Se añadieron los siguientes antibióticos en función al plásmido a seleccionar: 5-10 µg/ml Tc, ampicilina (Ap) 100-200 µg/ml y kanamicina (Km) 30 µg/ml. El medio sólido se preparó igualmente con TY y 1.5% agar. Para la inducción de la sobreexpresión de proteínas en cultivos de *E. coli* BL21(DE3) se utilizó TY o medio mínimo M9 suplementado con 0.1 mM de CaCl₂, 2

mM de MgSO₄, 0.2% de glucosa y el antibiótico correspondiente. Para la expresión de proteínas marcadas con Se-Met en la estirpe *E. coli* B834(DE3), auxótrofa para metionina, se utilizó un medio mínimo enriquecido (MME) y el antibiótico correspondiente (véase Tabla 3 y el apartado 6.3 de Métodos). Para la puesta en competencia y transformación de *E. coli*, se usó el medio SOB. Tras la electroporación se recuperaron las células en medio SOC (medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa). Los cultivos de *E. faecalis* se crecieron en medio Brain-Heart (Difco) o ESTY (Pronadisa), seleccionando en los casos en que se requería con 4 µg/ml Em y/o 4 µg/ml Tc.

Tabla 3. Composición del medio mínimo enriquecido (MME).

	Concentración final	400 ml
M9 (10x)	1x	40 ml
Glucosa 40% (2,22 M)	20 mM	3.6 ml
MgSO ₄ 1M	2 mM	800 µl
FeSO ₄ (7 H ₂ O) 10 mg/ml	10 µg/ml	400 µl
CaCl ₂ 10 mg/ml	10 µg/ml	400 µl
CuSO ₄ (5H ₂ O) 10 mg/ml	1 µg/ml	40 µl
MnCl ₂ 10 mg/ml	1 µg/ml	40 µl
ZnCl ₂ 10 mg/ml	1 µg/ml	40 µl
Vitaminas ^a 1mg/ml	10 µg/ml	4 ml
AA I ^b 4 mg/ml	40 µg/ml	4 ml
AA II ^c 1 mg/ml	40 µg/ml	16 ml
Metionina ó Se-Met 10 mg/ml	50 µg/ml	2 ml
Km 30 mg/ml	30 µg/ml	400 µl
Agua	-	324.36 ml

^aVitaminas: Riboflavina, piridoxina, tiamina y biotina.

^bAA-I: mezcla de aminoácidos Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ile, Ser, Thr, Pro, Val.

^cAA-II: mezcla de aminoácidos Phe, Tyr y Trp.

3. ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1. Plásmidos

Tabla 4. Listado de los plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Tamaño ^a	Características ^b	Referencia
pAMβ1	26.500	Plásmido conjugativo de <i>E. faecalis</i> DS5; Em ^R	(Janniére <i>et al.</i> , 1990)
pMV158	5.540	Original de <i>Streptococcus agalactiae</i> ; movilizable por pAMβ1; Tc ^R	(Burdett, 1980)
pMV158GFP	6.900	Derivado de pMV158 con el gen <i>gfp</i> clonado bajo el promotor inducible P _M ; Tc ^R	(Nieto & Espinosa, 2003)
pLS1	4.408	Derivado de pMV158 sin el fragmento EcoRI 1.1 Kb; no movilizable ($\Delta mobM$, $\Delta ssoU$); Tc ^R	(Stassi <i>et al.</i> , 1981)
pLS1G3G7	4.408	pLS1 mutante en RS _B y CS-6 del origen <i>ssoA</i> ; no movilizable ($\Delta mobM$, $\Delta ssoU$); Tc ^R	(Kramer <i>et al.</i> , 1997)
pLS1ΔNA	4.209	Delección <i>ssoA</i> en pLS1; no movilizable ; Tc ^R	(Hernández-Arriaga <i>et al.</i> , 2000)
pMV158G3G7	5.540	Mutante <i>ssoA</i> ; cambios en RS _B (6-nt) y CS-6 (9-nt); Tc ^R	Este trabajo
pMV158ΔBD	5.335	Mutante <i>ssoU</i> ; delección de las regiones RS _B y CS-6 (fragmento <i>BsaI-DraI</i> , de 205 pb); Tc ^R	Este trabajo
pMV158G3G7ΔBD	5.335	Doble mutante <i>ssoA-ssoU</i> ; combinación de los mutantes G3G7 y ΔBD; Tc ^R	Este trabajo
pMV158ΔNA	5.341	Delección <i>ssoA</i> en pMV158; no movilizable (delección en extremo 3' del gen <i>mobM</i>); Tc ^R	Este trabajo
pLGM2	7.586	Doble fragmento <i>Tth1111-NcoI</i> de pMV158 clonado en vector pET5; Ap ^R	(Guzmán & Espinosa, 1997)
pET-24b	5.309	Vector clonaje para la expresión de proteínas bajo el promotor φ10 del fago T7; Km ^R	Novagen
pMobM(Y44F)	6.777	Clon pET-24b:: <i>mobM</i> (A131T); Km ^R	Este trabajo
pMobMN199	5.834	Clon pET-24b:: <i>mobM</i> -N199; Km ^R	Este trabajo
pMobMN199His	5.384	Clon pET-24b:: <i>mobM</i> -N199His; Km ^R	Este trabajo
pMobMN199(H22A)	5.384	Clon pET-24b:: <i>mobM</i> -N199(C64G/A65C); Km ^R	Este trabajo

Tabla 4 (continuación)

Plásmido	Tamaño ^a	Características ^b	Referencia
pMobMN199(Y122F)	5.384	Clon pET-24b <i>mobM</i> :: <i>mobM</i> -N199(A365T) ; Km ^R	Este trabajo
pMobMN243	5.492	Clon pET-24b:: <i>mobM</i> -N243; Km ^R	Este trabajo

^aEl tamaño se indica en pares de bases (pb).

^bEm^R, Tc^R, Ap^R, Km^R: resistencia a eritromicina, tetraciclina, ampicilina y kanamicina, respectivamente.

3.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se sintetizaron 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 etapa final de purificación por HPLC y se resuspendieron en agua Milli-Q estéril a una concentración de 100 µM.

Tabla 5. Oligonucleótidos

Nombre ^a	Bases	Secuencia (5´-3´) ^b	Coordenadas ^c
mobM-F	18	AAAGCACCCCTCACATGC	4116-4134
ssoA-R	18	TCACAACGCTCACCTCCA	5495-5477
ssoU-F	20	GGGATCAACTTTGGGAGAGA	3121-3140
ssoU-R	20	GCGTCTCAAAAACACGTTC	3819-3799
Dral-F	19	GGTGGAGATTTTTTGAGTG	3370-3389
Dral-R	29	CACGTTCAATTATGCTTTIAAAGCTCCTCCC	3807-3779
Rsal	26	GACTTGTCTTTTCGAGTACCGAAAGAC	3715-3690
PR-1	19	GCTCTGCGAGGCTGTCCGGC	3565-3547
Cop-F	20	CGCCTTTAGCCTTAGAGCTG	489-508
Cop-R	19	CAGCTCCCAGTCGCTTGGA	924-906
PR-2	19	GGTCGGCACTGCCGACAGC	3537-3555
PE-R	24	GCAACCATGTAACATAGATTTTC	3748-3725
F1	24	AACTGGTAGTTTAGCACAAATTCG	3643-3620
NdeI-F	24	AAGGAGGGAAACATATGAGTTACA	3718-3741
Xho-R	24	CTTTCGGCTCGAGACGTCTAGCG	5287-5264
P244stop-Xho	35	CTTGGTTAGTTGTCTCGAGTATCTAAGATTGAACT	4485-4451
E200stop-XhoI	30	GAAGTTCCTCCTCGAGTTACATATCAGCCA	4347-4318

Tabla 5 (continuación)

Nombre ^a	Bases	Secuencia (5'-3') ^b	Coordenadas ^c
XhoHis-R	30	GAAGTTCTC <u>CT</u> CGAGTTCCATATCAGCCA	4347-4318
H22A-F	22	AGCTTTTAAG <u>GC</u> TAATGAACGT	3785-3806
H22A-R	22	ACGTTTCATTAG <u>GC</u> CTTAAAAGCT	3806-3785
Y44F-F	21	CACCTCAACT <u>TC</u> CGAGTTGACG	3852-3872
Y44F-R	21	CGTCAACTCG <u>AA</u> AGTTGAGGTG	3872-3852
Y122F-F	21	AATATTGCTTT <u>IT</u> GCGAGTGTT	4086-4106
Y122F-R	21	AACACTCGCA <u>AA</u> AGCAATATT	4106-4086
ORIT	41	CACACACTTTATGAATATAAAAGTATAGTGTG/TTATACTTTA	3565-3605
ORIT-Cy5	41	CACACACTTTATGAATATAAAAGTATAGTGTG/TTATACTTTA-Cy5	3565-3605
ORITc	41	TAAAGTATAACACACTATACTTTATATTCATAAAAGTGTGTG	3605-3565
IR1	18	ACTTTATGAATATAAAAGT	3570-3587
IR2	24	TAAAGTATAGTGTG/TTATACTTTA	3582-3605
IR2-Cy5	24	TAAAGTATAGTGTG/TTATACTTTA-Cy5	3582-3605
IR3	31	CACACACTTTATGAATATAAAAGTATAGTGTG/	3565-3595
Cy5-IR3	31	Cy5-CACACACTTTATGAATATAAAAGTATAGTGTG/	3565-3595
IR1+8	26	ACTTTATGAATATAAAAGTATAGTGTG/	3570-3595
IR1-R	11	GAATATAAAAGT	3577-3587
IR3-L	14	CACACACTTTATGA	3565-3578
IR3-R	15	ATAAAGTATAGTGTG/	3581-3595
10-NIC	10	GTATAGTGTG/	3586-3595
19-NIC-4	23	GAATATAAAAGTATAGTGTG/TTAT	3577-3599
T7-promoter	17	TAATACGACTCACTATA	4984-5000
T7-Terminator	19	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	5241-5223

^aF, forward; R, reverse.

^bSe han subrayado los cambios de bases introducidos para incluir dianas de restricción. En negrita se indican los cambios para generar un codón STOP. "/" indica el sitio específico de corte para la proteína MobM. Los oligonucleótidos ORIT-Cy5 y IR2-Cy5 incluyen el fluoróforo Cy5 en el extremo 3'. El oligonucleótido Cy5-IR3 contiene el fluoróforo en el extremo 5'.

^cCoordenadas correspondientes en la secuencia del plásmido pMV158, salvo para los oligonucleótidos T7-primer y T7-terminator (plásmido pET-24b).

4. 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*), el fragmento Klenow de la DNA

polimerasa de *E. coli*, la DNasa I de páncreas bovino, IPTG, inhibidor de proteasas *Complete*, Ap, rNTPs y dNTPs no radiactivos. La DNA polimerasa *Phusion* se adquirió de Finzymes. De Promega se adquirió la transcriptasa reversa AMV. Invitrogen suministró la transcriptasa reversa *Thermoscript* y el marcador preteñido de pesos moleculares de proteínas (*SeeBlue Plus 2*). Biorline proporcionó el marcador de peso molecular de DNA *HyperLadder 1*. De Ambion se obtuvo el tampón de hibridación ULTRAhyb y el inhibidor RNasas SUPERase-In. Sigma suministró las siguientes enzimas: proteinasa K, RNasa A, lisozima, seroalbúmina bovina (BSA), lisostafina, lisozima y mutanolisina; antibióticos: Em, Tc y Nov; además de polietilenimina (PEI), permanganato potásico (KMnO₄), DMSO, Carboxipeptidasa-A (CPA), selenometionina, imidazol y la resina *HIS-Select Nickel Affinity Gel*. Merck suministró el dimetilsulfato (DMS), etanol 100%, ácido clorhídrico, cloroformo y propanol, además de todos los aminoácidos, vitaminas, hidratos de carbono (sacarosa, maltosa y glucosa) y cationes divalentes (Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺ y Co²⁺). El fenol saturado se obtuvo de AppliChem. Los componentes de los medios de cultivo se obtuvieron de Pronadisa, Merck, Sigma, BD y Difco. De Amersham, el marcador de peso molecular proteínas (LMW), las columnas Microspin G-25 y la columna *HiLoad Superdex 200*. El kit de secuenciación de DNA se obtuvo de USB Corporation. Los nucleótidos radiactivos de Perkin-Elmer, Amersham y Harmann. La agarosa, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato amónico, β-mercaptoetanol, SDS, Triton X-100, Commassie Bio-safe, resina de agarosa-heparina Affi-Gel, el Kit de extracción de RNA (*Aurum total RNA extraction Kit*) y membranas de PVDF se adquirieron de BioRad. Para la purificación de fragmentos de DNA de agarosa y limpieza de reacciones de PCR o digestiones enzimáticas se utilizó el kit *QIAquick* de Quiagen. Para extraer DNA plasmídico se utilizó el kit *Midiprep* de Genomed. Las membranas para diálisis se obtuvieron de Spectrum, y las diapositivas de diálisis de Pierce. Las películas de autorradiografía fueron *X-Omat S* de Kodak. Las pantallas amplificadoras empleadas fueron *Cronex Ligthingplus* de Dupont. Las placas de revelado radiactivo en el equipo Phosphorimager (*Imaging Plates*) se obtuvieron de Fuji. Los filtros de nitrocelulosa (0.22 o 0.45 μm) y las placas multipocillo *MultiScreen HTS* (GV con filtro Durapore estéril) se adquirieron en Millipore. Las cubetas de electroporación de 2mm de CellProjects. Los viales de concentrado de muestras de proteína Macro- y Micro-sep fueron de la casa Pall.

5. TAMPONES

Tabla 6. **Tampones.**

TAMPÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
TE	Tris-HCl 10 mM pH 8.0 EDTA 1mM	Resuspensión de DNA
TAE	Tris base 40 mM Ácido acético 20 mM EDTA 2 mM pH 8.1	Electroforesis de DNA en geles de agarosa
TBE	Tris base 89 mM Acido bórico 89 mM EDTA 2.5 mM pH 8.3	Electroforesis de DNA en geles de agarosa y 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-ME 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
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 y variantes. Se suplementa con NaCl a distintas concentraciones
B	Tris-HCl 20 mM pH 7.6 EDTA 0.1 mM DTT 1 mM Glicerol 1% MgCl ₂ 15 mM	Actividad de corte de MobM y variantes sobre DNA plasmídico o monocatenario
FXBE	Formamida 80% Xilencianol 0.1% Azul de bromofenol 0.1% EDTA 10 mM	Colorante de carga para electroforesis de RNA
HIS	Tris-HCl 10 mM pH 7.6 β-ME 5 mM Glicerol 5% NaCl 1M	Purificación de proteínas con cola de histidinas. Suplementado con diferentes concentraciones de imidazol

Tabla 6 (continuación)

TAMPÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
CPA	Tris-HCl 20 mM pH 8.1 MnCl ₂ 2 mM	Eliminar cola de histidinas con carboxipeptidasaA
SSC 20x	Citrato sódico 0.3 M NaCl 3 M	Solución de transferencia Southern
MT	Ácido trifluoroacético 2%	Análisis de masas por MALDI-TOF
UA	Tris-HCl 20 mM pH 7.6 EDTA 1 mM Glicerol 1% NaCl 300 mM	Análisis de proteínas por ultracentrifugación
EOG	Acetato amónico 0.5 M Acetato magnésico 10 mM SDS 0.1%	Elución de oligonucleótidos de geles de PAA desnaturalizantes
ME	Tea-HCl pH 7.5 MgCl ₂ 10 mM	Adsorción de la muestra al soporte de mica en microscopía electrónica
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
AN	Tris-HCl 1M pH 8.0 EDTA 1 mM NaCl 100 mM	Anillamiento de oligonucleótidos
STOP KMnO4	Acetato-Na 600 mM pH 4.8 β-ME 3M EDTA 40 mM pH 8.0	Solución de parada de oxidación de DNA por KMnO4
STOP DMS	Acetato amónico 3M β-ME 1M EDTA 20 mM pH 8.0	Solución de parada de metilación de DNA por DMS
STOP DNasa I	NaCl 200 mM SDS 1% EDTA 20 mM pH8.0	Solución de parada de digestión de DNA por DNasa I. Suplementado con 0.2 mg/ml proteinasa K
LCS	Sacarosa 25% Citrato trisódico 150mM SDS 0.01% Na-DOC 0.1%	Lisis de <i>S. pneumoniae</i> para extractos crudos
LCE	Sacarosa 25% NaCl 100 mM Lisozima 10 µg/µl	Lisis de <i>E. faecalis</i> para extractos crudos
LRS	Tris-HCl 50mM, pH 7.6 EDTA 1 mM NaCl 50 mM Na-DOC 0.1%	Lisis de <i>S. pneumoniae</i> para extracción de RNA total
PBS	Na ₂ HPO ₄ 12.7 mM KH ₂ PO ₄ 2.2 mM KCl 3.5 mM NaCl 170 mM	Resuspensión de células para las lecturas de fluorescencia de GFP

Tabla 6 (continuación)

TAMPÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
CD1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM Sulfato amónico 50 mM pH 7.6	Lectura de espectros por dicroísmo circular
CD2	Hepes 20 mM pH 7.6 Sulfato amónico 50 mM	Barridos de temperatura por dicroísmo circular en presencia de cationes
ITC	Hepes 20 mM pH 7.6 NaCl 400 mM	Análisis de proteínas por calorimetría

6. SOPORTE INFORMÁTICO

Tabla 7. Soporte informático

	PROGRAMA	DIRECCIÓN WEB / COMPAÑÍA
Búsqueda homologías	Blast	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Búsqueda promotores	BPROM	linux1.softberry.com/berry.phtml
Búsqueda pautas de lectura	ORF Finder	ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf
Diseño oligonucleótidos	Primer_3	frodo.wi.mit.edu
Análisis oligonucleótidos	OligoAnalyzer	eu.idtdna.com
	Tm calculator	finnzymes.fi/tm_determination.html
Mapas de restricción	ApE	biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape
	NEBCutter	tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
Lectura secuencias DNA	Chromas	mb.mahidol.ac.th/pub/chromas
	ApE	biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape
Alineamiento secuencias	ClustalW	ebi.ac.uk/Tools/clustalw2
Análisis filogenético	MEGA4	megasoftware.net
Estructura 2 ^{ia} DNA	Mfold	mfold.bioinfo.rpi.edu
Análisis sec. 1 ^{ia} proteínas	ProtParam	expasy.ch
Estructura 2 ^{ia} proteínas	PsiPred	bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred
	Jpred	compbio.dundee.ac.uk/www-jpred
	SABLE	sable.cchmc.org
	PredictProtein	predictprotein.org
	NPS@	npsa-pbil.ibcp.fr

Tabla 7 (continuación)

	PROGRAMA	DIRECCIÓN WEB / COMPAÑÍA
Deconvolución espectros CD	CONTINLL / SELCON	dichroweb.cryst.bbk.ac.uk
Velocidad de Sedimentación	SEDFIT	analyticalultracentrifugation.com
	SEDNTERP	jphilo.mailway.com
Equilibrio de Sedimentación	Heteroanálisis	biotech.uconn.edu
Visualización estructuras 3D	PyMol	pymol.org
Análisis ITC y DSC	Origin 7	Microcal
Lectura DNA fluorescente	ImageQuant™	Molecular Dynamics
Lectura DNA radiactivo	Image-reader	Fuji
Análisis de geles	QuantityOne	BioRad
Análisis CD	SpectraManager	Jasco
Representación gráfica	SigmaPlot	SigmaPlot

MÉTODOS

1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Los cultivos de *E. coli* y *E. faecalis* en medio líquido se crecieron en condiciones de aireación en matraces con una capacidad cinco veces mayor que el volumen del cultivo y agitación continua a una velocidad de 150-200 rpm. En medio sólido el crecimiento de los cultivos fue en superficie. Para los cultivos de *S. pneumoniae* se utilizaron condiciones microaerófilas de crecimiento. En medio líquido se utilizaron baños sin agitación y tubos cuya capacidad no sobrepasaba el doble del volumen del cultivo. Para el crecimiento 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, sin antibióticos y con 0,75% de agar. 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* y 650 nm para *E. faecalis* y *S. pneumoniae*. Para ello, se empleó un espectrofotómetro Bausch & Lomb (Spectronic 20D+). Para la conservación de las estirpes se crecieron cultivos hasta una DO de 0.3, posteriormente se añadió un 10% de glicerol y se mantuvieron a 37°C durante 10 min, y después de otros 10 min a 4°C, se congelaron a -70°C en tubos de 2 ml (con tapón a rosca).

2. CLONACIÓN DE DNA

2.1. Preparación de células competentes

Las células electrocompetentes de *E. coli* se prepararon a partir de cultivos de la cepa de interés en medio SOC, crecidos hasta la fase exponencial ($DO_{600} = 0.5$) con agitación fuerte. 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 μ l, se congelaron a -70°C. Las células competentes de *S. pneumoniae* se prepararon siguiendo el método descrito previamente (Lacks, 1966). Básicamente, se realizaron tres diluciones sucesivas del cultivo en medio fresco y tras alcanzar la fase exponencial ($DO_{650} = 0.3$), se añadió glicerol al 10% y se congeló a -70°C.

2.2. Preparaciones de DNA

2.2.1. Extractos crudos celulares

La preparación de extractos crudos celulares sirvió para analizar el contenido en DNA total de las estirpes en estudio. Básicamente, se resuspendió el sedimento de células (crecidas hasta una $DO_{600}=0.4$) en 100 μ l de un tampón de lisis, cuya composición varió dependiendo de la especie bacteriana. Para *S. pneumoniae* se empleó el tampón LCS y para *E. faecalis* el tampón LCE (ver Tabla 6), suplementado en ambos 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 (-70°C) y descongeló (37°C) cada tubo 3 veces consecutivas. Por último, después de añadir proteinasa K (0.25 mg/ml) e incubar otros 10 min a 24°C, se añadió 50 μ l de tampón CEC (3x) a cada muestra y la presencia de DNA plasmídico se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

2.2.2. Extracción de DNA plasmídico

La purificación del plásmido pMV158 se llevó a cabo con dos gradientes sucesivos de CsCl/BrEt (del Solar *et al.*, 1987a). Las preparaciones de plásmido de cultivos de *E. coli* se realizaron con un kit comercial (High Pure plasmid isolation kit, Roche). Los diferentes derivados plasmídicos de pMV158 se aislaron de cultivos de *S. pneumoniae* mediante el método de extracción alcalina (Birnboim & Doly, 1979; Stassi *et al.*, 1981). También se usó para este propósito un kit de minipreparaciones de DNA plasmídico (Genomed) con algunas variaciones en la composición del tampón de lisis, añadiendo deoxicolato sódico (Na-DOC) al 0.1%.

2.3. Obtención de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA empleados en esta tesis se obtuvieron a través de digestión con enzimas de restricción o amplificación por PCR.

2.3.1. 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 digestiones dobles con enzimas cuyo tampón y temperatura de reacción era compatible, suplementando con BSA (10 μ g/ml) en el caso de que alguna de ellas lo requiriera. En general, los tiempos de digestión no excedieron las tres horas y siempre se inactivó el enzima mediante desnaturalización térmica (10 min a 65°C).

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

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en una solución de 50-100 µl que 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 (Roche), 0.4 µM de los cebadores, 0.65 U de polimerasa Phusion (Finnzymes) y DNA molde (1 ng de DNA plasmídico o 10 ng de DNA cromosómico). En todas las amplificaciones se utilizó un termociclador iCycler (BioRad). Las condiciones de temperatura fueron las siguientes: un paso inicial a 98°C durante 30 s, seguido por 30 ciclos de 10s a 98°C, 20s a 50-56°C, y 30s a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C.

2.4. Purificación

2.4.1. DNA bicatenario

Los fragmentos de DNA obtenidos por restricción o PCR se purificaron a partir de geles preparativos de agarosa al 1%, eliminando así restos de la digestión o productos inespecíficos de amplificación, respectivamente. Una vez cortada la banda de interés, y dependiendo del tamaño del fragmento, el DNA se recuperó mediante extracción con fenol (Maniatis *et al.*, 1982), o usando un kit de extracción de gel con columnas (QIAquick de Quiagen). En los casos en que la calidad del DNA era suficiente, no fue necesaria la extracción desde gel y directamente se limpiaron y dializaron las muestras usando las columnas del mismo kit.

2.4.2. Oligonucleótidos

La purificación de oligonucleótidos consistió en la extracción desde geles de PAA según se describe en (Maniatis *et al.*, 1982). Las muestras se mezclaron con un volumen de tampón de carga BXF (Tabla 6), se calentaron a 85°C durante 5 min y se mantuvieron en mezcla de agua y hielo hasta el momento de la aplicación en el gel. Tras la electroforesis, se colocó el gel encima de una placa de cromatografía fluorescente (Fluor-coated TLC plate, Ambion), y se irradió con luz UV de onda corta. El DNA contenido en el gel se visualizó como una serie de bandas oscuras sobre el fondo fluorescente de la placa de cromatografía. Se recortó la región del gel que contenía la banda correspondiente al oligonucleótido entero y se incubó a 42°C, toda la noche, en tampón de elución EOG. El DNA eluido se separó de los restos de acrilamida por filtración con los tubos Spin-X, se redujo el volumen con sucesivas extracciones en 1-butanol y se precipitó con etanol al 100%. Tras la precipitación, el DNA se disolvió en tampón TE y se dializó en una columna Microspin G-25 (Amersham Bioscience) para eliminar sales.

2.5. Ligación de DNA

La ligación de fragmentos DNA se llevó a cabo en mezclas de reacciones diluidas o concentradas dependiendo, respectivamente, de si se requería recircularizar la misma molécula o bien ligar dos moléculas diferentes. En este segundo caso, la relación molar entre vector e inserto fue de 1:5. Cuando los DNAs implicados tenían extremos no cohesivos, antes de la ligación se procedió al relleno de los extremos 5' protuberantes con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Maniatis *et al.*, 1982). En general, las condiciones de reacción fueron las recomendadas por la casa suministradora, incubando las mezclas con 20 U de ligasa del fago T4 (BioLabs), a 10-14°C durante 12 horas e inactivando posteriormente 10 min a 65°C. A continuación, el DNA se sometió a extracciones sucesivas con N-Butanol y se resuspendió en 5 µl de agua Milli-Q estéril.

2.6. Transformación

2.6.1. Transformación natural

Todas las construcciones plasmídicas derivadas de pMV158 se recuperaron mediante transformación natural de células competentes de la estirpe T4 de *S. pneumoniae* (Espinosa *et al.*, 1982). En resumen, se diluyeron las células en medio AGCH suplementado con 70 µM CaCl₂ y 0.2% sacarosa, y se añadió posteriormente el DNA transformante. Tras un periodo de incorporación del DNA a 30°C, las transformaciones se incubaron a 37°C durante 1.5 horas para permitir la expresión fenotípica, en condiciones de inducción dependiendo del marcador de selección empleado. El aislamiento de colonias transformantes se llevo a cabo mediante crecimiento en placa, tal como se describe en el apartado 1 de Métodos.

2.6.2. Transformación mediante electroporación

En general, las células de *E. coli* se transformaron por electroporación siguiendo el método descrito (Dower *et al.*, 1988). En todos los caso el DNA transformante estaba resuspendido en agua Milli-Q estéril y se mezcló con 50 µl de células competentes en una cubeta de electroporación de 2mm previamente enfriada a 4°C. El pulso eléctrico se aplicó en un electroporador Gene Pulser (BioRad), con las siguientes condiciones: 25 µF, 2.5 kV/cm y 200Ω. Las transformaciones 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. La selección de transformantes se realizó mediante siembra en placas con medio TY y el antibiótico adecuado.

2.7. Construcción de plásmidos recombinantes

2.7.1. Vectores de expresión de mutantes de la proteína MobM

La conversión del codón E200 (GAA) del gen *mobM* en un codón STOP (TAA, ocre), permitió la expresión de MobMN199, una versión truncada de la proteína MobM con solo los primeros 199 aminoácidos de la región N-terminal. En resumen, se amplificó por PCR la región delimitada por los oligonucleótidos NdeI-F y E200stop-XhoI (véase Tabla 5), usando como molde DNA de pMV158. Se obtuvo un producto de 630 pb que fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, y se ligó con DNA del vector pET24(b) tratado previamente con las mismas enzimas, resultando el plásmido recombinante pMobMN199. Cuando se siguió exactamente la misma estrategia, pero se substituyó el oligonucleótido reverso por otro que no contenía el cambio de codón (oligonucleótido XhoIHis-R), se obtuvo el vector pMobMN199His con el que se pudo purificar la versión truncada MobMN199His, que contenía 6 histidinas en el extremo carboxilo. La expresión de MobMN243, otra 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). Concretamente, tras amplificar la región delimitada por los oligonucleótidos NdeI-F y P244stop-XhoI (768 pb) y digerir el producto obtenido con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, se clonó en el vector pET24(b), resultando el plásmido pMobMN243.

Por otro lado, la construcción de plásmidos recombinantes con mutaciones en el gen *mobM* se llevó a cabo mediante una estrategia de mutagénesis dirigida por PCR en dos rondas de amplificación consecutivas. En concreto, el cambio A131T en la secuencia codificante del gen *mobM* hizo posible la expresión de MobM(Y44F), en la que la tirosina en posición 44 fue substituida por fenilalanina. Para ello, usando como molde DNA de pMV158, se amplificaron dos fragmentos de DNA con los cebadores Nde-F/Y44F-R (155 pb) y con los cebadores Y44F-F/XhoI-R (1436 pb). Tras la mezcla, desnaturalización y extensión de los productos resultantes, se llevó a cabo una segunda amplificación con los cebadores Nde-F y XhoI-R (1570 pb). Por último se procedió a la digestión de este fragmento y de pET24(b) con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, y se ligaron como se indica en el punto 2.5, resultando el vector pMobM(Y44F). A su vez, utilizando los oligonucleótidos correspondientes (véase Tabla 5), se construyeron una serie de plásmidos que denominamos pMobMN199(H22A), y pMobMN19(Y122F), útiles para purificar mutantes de MobMN199 en que se substituyeron diferentes residuos por Ala o Phe. Todas las construcciones obtenidas se

confirmaron mediante secuenciación automática con los cebadores T7-primer y T7-terminator (ver Tabla 5).

2.7.2. Mutantes en los orígenes de cadena retrasada (sso) de pMV158

Para construir el plásmido pMV158 Δ BD se trató DNA de pMV158 con las enzimas de restricción *Bsal* y *DraI*. El extremo 5' protuberante generado por *Bsal* se rellenó con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y se favoreció la recircularización del DNA en una reacción diluida, mediante ligado de extremos romos con la T4 DNA ligasa. En el plásmido resultante se eliminó por completo una región de 205 pb (coordenadas 3222 a 3428) que contenía el origen de cadena retrasada *ssoU*. Por otro lado, se clonó el fragmento pequeño de restricción originado tras digerir DNA de pMV158 (1132 pb) o pMV158 Δ BD (927 pb) con *EcoRI*, dentro del plásmido pLS1G3G7, cuyo origen *ssoA* contiene cambios nucleotídicos en la secuencia de las regiones RS_B y CS-6 (Kramer *et al.*, 1997). El resultado fue un derivado del plásmido pMV158 deficiente en la funcionalidad del *ssoA* (pMV158G3G7) y un derivado deficiente por completo en la funcionalidad de los dos *sso* (pMV158G3G7 Δ BD). La confirmación de las construcciones obtenidas se obtuvo mediante secuenciación automática con las parejas de cebadores *ssoU-F/ssoU-R* y *mobM-F/ssoA-R* (Tabla 5).

3. ANÁLISIS DE DNA

3.1. Cuantificación

La concentración y calidad de las muestras de DNA se calculó con la ayuda de un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC, midiendo el espectro de absorción de las soluciones entre las longitudes de onda de 220 y 350 nm, estimando que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 o 33 μ g/ml para dsDNA o ssDNA, respectivamente. En algunos casos, la cuantificación de dsDNA lineal se determinó por densitometría mediante electroforesis en geles de agarosa o PAA teñidos con BrEt, 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 (HyperLadder I, Bionline).

3.2. Electroforesis

3.2.1. Geles de Agarosa

La separación de DNA plasmídico o lineal se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa a temperatura ambiente. Para la

aplicación en el gel, las muestras se disolvieron en los tampones de carga BXGE o SBE. Condiciones tales como la concentración de agarosa (entre 0,7% y 2%), 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 a una concentración de 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$, durante 30 min a 24°C. En el análisis de extractos crudos celulares fue necesaria la tinción del DNA durante la electroforesis, de manera que se incluyó BrEt en el gel y en el tampón de carrera. El DNA se visualizó con luz ultravioleta de onda corta (260 nm) en un transiluminador GelDocXR (BioRad) y la imagen resultante se capturó con el software QuantityOne (BioRad).

3.2.2. Geles de Poliacrilamida

3.2.2.1. Geles PAA nativos

La electroforesis de fragmentos de DNA en geles nativos de PAA se realizó en geles verticales con el sistema Mini Protean-II (BioRad). Normalmente, las muestras se mezclaron con tampón de carga BXGE, la concentración de PAA fue de 6% en tampón TBE y se aplicó un voltaje de 100 V durante la carrera. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron y visualizaron como se indica en el punto anterior.

3.2.2.2. Geles PAA desnaturalizantes

La purificación de oligonucleótidos se realizó mediante electroforesis en geles verticales de PAA al 12% con 8 M de urea. 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: voltaje constante de 50-60 W, 120-150 min de duración y a una temperatura de 50°C. Por otro lado, los productos de reacción en los ensayos de actividad de corte de MobM sobre oligonucleótidos se analizaron en minigeles de PAA al 20%, con 8 M de urea, empleando cubetas MiniProtean III (BioRad). En todos los casos se llevó a cabo una pre-electroforesis durante 30 min en las mismas condiciones de carrera, hasta que la temperatura del sistema alcanzó los 50°C. Las muestras se mezclaron con un volumen de colorante de carga BXF1x (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 aplicación en el gel. Se empleó TBE como tampón de electroforesis (Tabla 6). Las bandas radiactivas se visualizaron por exposición autorradiográfica y revelado de pantallas X-Omat (Kodak), o mediante el sistema Phosphorimager (Fuji).

3.3. Secuenciación

3.3.1. Secuenciación Manual

Para la secuenciación manual del DNA se siguió el método de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977) con ayuda de un kit comercial (*Sequenase v2.0 DNA Sequencing kit*, USB Corporation). Como DNA molde se utilizó 1 µg de DNA plasmídico desnaturalizado por álcali y se anilló con 1.5 pmol de un cebador marcado radiactivamente en el extremo 5' con ^{32}P (ver más adelante). Después de añadir 6.5 U de enzima Sequenasa, las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante un tiempo que varió entre 30 s y 3 min, dependiendo de la longitud de la secuencia requerida en el análisis. Inmediatamente se repartió la mezcla entre cuatro tubos que contenían los dideoxinucleótidos (ddNTPs) de A, G, C y T, y se incubó a 37°C durante 5 min. A continuación, las reacciones de secuencia fueron procesadas como se indica en el punto 3.2.2 de este capítulo para el análisis en geles de PAA.

3.3.2. Secuenciación Automática

La composición nucleotídica de todos los DNAs obtenidos por clonación se verificó mediante el envío de las muestras al Servicio de Secuenciación Automática de DNA del CIB (Secugen).

4. MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA

Dependiendo de los requerimientos experimentales, se llevaron a cabo marcajes de oligonucleótidos en el extremo 5' utilizando [γ - ^{32}P] ATP (actividad específica de 3000 Ci/mmol) o bien se emplearon oligonucleótidos no marcados y se incorporó el isótopo radiactivo [α - ^{32}P] dCTP (400 Ci/mmol) durante la amplificación o extensión del DNA (marcaje interno).

4.1. Marcaje en el extremo 5'

El uso de oligonucleótidos marcados radiactivamente fue útil tanto para realizar amplificaciones mediante PCR como para extensiones lineales en los ensayos de *footprinting*, retrotranscripción o secuenciación manual de DNA. Se siguió el método descrito (Maniatis *et al.*, 1982) utilizando el enzima T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs). La reacción de marcaje se realizó en el tampón proporcionado por el fabricante, con 80 pmoles de [γ - ^{32}P] ATP, incubando a 37°C durante 1 hora. La mezcla de reacción contenía entre 30 y 60 pmoles de oligonucleótido, dependiendo de la actividad específica requerida en el marcaje, y 10 U de enzima. El nucleótido radiactivo no incorporado se eliminó por cromatografía de filtración, empleando columnas de Sephadex Microspin-G25 (Amersham Bioscience).

4.2. Marcaje interno

La incorporación de un isótopo radiactivo en la amplificación por PCR permitió el marcaje de sondas específicas de DNA. Las reacciones se realizaron según las condiciones descritas en el apartado 2.3 de este capítulo, añadiendo 0,23 μM de nucleótido dCTP radiactivo (^{32}P en la posición α). 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.

5. MANIPULACIÓN DE RNA

Para localizar el inicio de transcripción del gen *mobM* se aplicaron técnicas de transcripción con RNA polimerasa sobre moldes de DNA (aproximación *in vitro*) y retrotranscripción sobre RNA total, extraído de células portadoras del plásmido pMV158 (aproximación *in vivo*).

5.1. Transcripción *in vitro*

Mediante PCR se amplificaron diferentes fragmentos de DNA (con extremos romos) que contenían la región promotora de interés. Los productos resultantes se purificaron desde geles de agarosa y se emplearon como moldes en los ensayos de transcripción *in vitro*. En resumen, las reacciones (50 μl) se llevaron a cabo con una mezcla que contenía 30 nM de DNA molde, rNTPs (250 nM cada uno), 2 mM DTT, 10 μCi de α - ^{32}P -UTP (3000 Ci/mmol), 0.2 U de SUPERase-In (Ambion) y 0.15 U de la RNA polimerasa de *E. coli*, en el tampón suministrado por la casa comercial (Epicentre). Tras incubar 30 min a 37°C, las muestras se pasaron a hielo y se eliminó el nucleótido no incorporado mediante cromatografía en columnas de Sephadex G-25 (Amersham). Posteriormente, las muestras se secaron bajo vacío y se resuspendió el pellet de RNA en 10 μl de tampón de carga FXBE. Luego, se calentaron 1-2 μl de cada una de las muestras a 85°C durante 5 min y tras enfriar en hielo, se aplicaron en minigeles desnaturalizantes de PAA al 6% y 8M de Urea. Una vez confirmada la calidad de los transcritos, las muestras se analizaron nuevamente en geles de secuenciación. Para estimar el tamaño de los RNAs se comparó con reacciones de secuenciación de DNA obtenidas por el método de Sanger. La carrera electroforética se realizó a 50-60 W hasta que el colorante xilencianol migró un 75% del gel. Posteriormente se fijó con una solución de ácido acético al 10%, se secó el gel y se reveló mediante el sistema Phosphorimager. En el análisis de los resultados se tuvo en cuenta que el peso molecular de un fragmento de RNA (-OH en posición 2', ribosa) es mayor que un fragmento de DNA (-H en 2', desoxirribosa) del mismo tamaño. Así,

se estimó que la movilidad electroforética del RNA es de un 5-10% menor que un DNA de la misma longitud.

5.2. Retrotranscripción

Para obtener el material de partida se realizaron extracciones de RNA total procedente de las estirpes *S. pneumoniae* T4 y de *E. coli* JM109, ambas portadoras del plásmido pMV158, utilizando un kit de preparaciones de RNA a pequeña escala (Aurum Total RNA Mini Kit, BioRad). Se siguieron las instrucciones del fabricante, con la excepción de que para *S. pneumoniae* se usó un tampón de lisis propio (tampón LSR, véase Tabla 6), y se incubó durante 10 min a 30°C. Las muestras obtenidas se congelaron a -70°C.

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron usando el sistema ThermoScript™ RT-PCR de Invitrogen, usando un cebador específico (PE-R; Tabla 5) de la región codificante del gen *mobM*. En concreto, se emplearon 15 µg de RNA total, 2 pmoles del cebador marcado en 5' con ³²P, dNTPs (1mM cada uno), 0.2 U de SUPERase-In (Ambion) y 15 U de la transcriptasa reversa. Antes de la adición del enzima, el RNA y el cebador se desnaturalizaron durante 5 min a 65°C. 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 resuspender en tampón BXF, se analizaron muestras en geles PAA desnaturalizantes como se indica en el apartado 3.2 de este capítulo. Para poder estimar la longitud del oligonucleótido extendido, se utilizaron reacciones de secuencia como referencia, obtenidas por el método Sanger utilizando el mismo oligonucleótido como cebador. Las bandas de DNA radiactivo se visualizaron por autorradiografía.

6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para sobreproducir MobM se empleó un vector previamente construido en nuestro laboratorio (Guzmán & Espinosa, 1997). En el caso de MobM(Y44F), MobMN199, MobMN199 con Se-Met, MobMN199His, o MobMN243 se utilizó el vector de expresión pET24 (Fig. 22). En este vector, el gen clonado se expresa bajo el control del promotor ϕ 10 del fago T7, empleando la estirpe *E. coli* BL21(DE3) o, en el caso de MobMN199 con Se-Met, la estirpe auxótrofa para metionina *E. coli* B834(DE3).

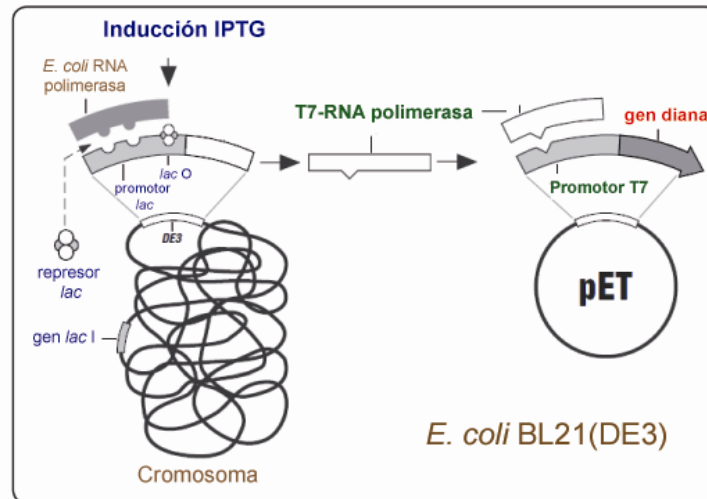


Figura 22. Sistema de expresión controlada de proteínas con los vectores pET en la estirpe de *E. coli* BL21(DE3).

En ausencia de IPTG, el represor *lac* se une a la región operadora del promotor *lacUV5* e impide la transcripción del gen de la T7-RNAP por parte de la RNAP de *E. coli*. En presencia de IPTG, se inhibe el represor y se inicia la síntesis de T7-RNAP, la cual reconoce el promotor $\Phi 10$ del fago T7 y transcribe el gen diana clonado en el vector pET. Modificado de *Tutorial sistemas pET* (Novagen).

6.1. MobM y derivados

En resumen, se crecieron cultivos (1-4 litros) a 37°C con fuerte agitación hasta que se alcanzó una $DO_{600} = 0,5$ 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 $\mu\text{g/ml}$) 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 1M de NaCl y, en el caso de MobM y MobM(Y44F) se dializó toda la noche frente a 3 l de tampón A sin NaCl, condiciones en las que la proteína precipita de forma diferencial. Tras centrifugar, se descartó el sobrenadante y el precipitado de proteína se reconstituyó en tampón A con 300 mM de NaCl. Debido a que las proteínas MobMN199 y MobMN243 siguen siendo solubles en condiciones de baja fuerza iónica, se omitió este paso de

purificación y se dializó directamente en tampón A con 300 mM NaCl. A continuación, las muestras se aplicaron en una columna de 100 ml de heparina-agarosa Affi-Gel (BioRad), equilibrada previamente con el mismo tampón, a un flujo de 50 ml/hora. 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 proteína se juntaron y dializaron frente 3 l de tampón A con 500 mM de NaCl. Posteriormente se concentró la muestra y se purificó mediante cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna HiLoad Superdex 200 y un equipo de HPLC (ÅKTA, Amersham). Se aplicó un flujo de 1 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 Macrosep (Pall), con un tamaño medio de poro de 3 kDa, hasta que la concentración fue de 5 mg/ml. Por último, el extracto concentrado se repartió en alícuotas de 100 μ l y se congelaron a -70°C para su conservación.

6.2. MobMN199His

En este caso se crecieron las células en 500 ml de medio a 37°C, con fuerte agitación, hasta alcanzar una $DO_{600}=0,5$. La inducción de la expresión de proteína y el procesado hasta romper las células en la prensa French, fue exactamente igual a como se describe en el punto anterior, salvo que se utilizó un tampón sin EDTA (tampón His; Tabla 6). 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 (HIS-Select Nickel Affinity Gel, Sigma), a un flujo de 30 ml/hora. Se lavó con 20 volúmenes de tampón His suplementado con imidazol (10mM) y se eluyó la proteína adherida con 5 volúmenes del mismo tampón en el que se aumento la concentración de imidazol hasta 250 mM. Tras el análisis correspondiente, las fracciones centrales se dializaron frente a tampón A con 300 mM NaCl. Posteriormente se procedió a la eliminación de la cola 6xHis del extremo carboxilo mediante tratamiento con Carboxipeptidasa-A (CPA) de Sigma, la cual se caracteriza por estar unida a bolas de agarosa y detener su actividad cuando reconoce un residuo de Glu. En concreto, se añadió 1 μ l de solución de CPA por cada μ g de proteína, y se incubó con tampón CPA, a 24°C y agitación suave hasta el siguiente día. Posteriormente, se eliminó la CPA mediante centrifugación y el sobrenadante se congeló a -70°C.

6.3. Purificación de MobMN199 con Selenio-Metionina

La producción de la proteína MobMN199 con Se-Met se llevó a cabo según se ha descrito (Budisa *et al.*, 1995), con algunas modificaciones. Partiendo de un preinóculo de la estirpe B834(DE3) con el plásmido pMobMN199, se inocularon 400 ml de medio mínimo enriquecido (MME; Tabla 3) y se incubó a 37°C con fuerte agitación hasta que alcanzó una $DO_{600} = 0,8$. A continuación, se centrifugaron las células durante 20 min a 3.500 rpm (4°C) y se resuspendió el sedimento en el mismo volumen de MME sin Metionina, incubando a 37°C y 200 rpm durante 30 min para agotar la metionina intracelular. Pasado este tiempo, los 400 ml de cultivo se diluyeron en 3.6 litros de MME suplementado con Se-Met a una concentración final de 50 µg/ml. Cuando se alcanzó una DO_{600} de 0.8-1, se indujo la hiperexpresión de la proteína mediante la adición de IPTG (1 mM), incubando en las mismas condiciones durante 3 horas. Se recogieron las células por centrifugación y se prosiguió con el protocolo empleado para la proteína MobMN199 (punto 6.1). Debido al carácter tóxico de la Se-Met, se trabajó en una campana de extracción durante todo el proceso de manipulación de los cultivos.

7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

7.1. Cuantificación

La secuencia específica de las proteínas en estudio permitió calcular su peso molecular teórico (Da) y coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Con esta información, la concentración y calidad de muestras de proteína pura se determinó midiendo el espectro de absorción entre las longitudes de onda de 220 y 350 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC.

7.2. Electroforesis desnaturizante en geles de 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 que varió entre un 10 y un 16 % 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 (BioRad). Antes de la aplicación, las muestras se disolvieron en tampón de carga SLB (Tabla 6) y se desnaturizaron 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 las proteínas a analizar.

7.3. Secuenciación del extremo NH₂

La secuencia amino-terminal de proteínas se determinó en el servicio de Química de Proteínas del CIB, aplicando degradación secuencial de Edman en un secuenciador Procise 494 (Perkin Elmer). El procesado previo de las muestras consistió en separar las muestras en geles SDS-PAGE, junto con un marcador de proteínas preteñido (SeeBlue Plus 2) para transferirlas posteriormente a membranas PVDF mediante el sistema Mini Trans-Blot (BioRad). A continuación, dicha membrana se sometió a tinción con una solución fresca de Coomassie, y tras desteñir y lavar con H₂O, se secó a temperatura ambiente para recortar las bandas de interés y proceder al análisis.

7.4. 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 MobMN199 y de sus propiedades hidrodinámicas. Los experimentos se realizaron con muestras de proteína a distintas concentraciones (2, 8 y 20 μM) en tampón UA, usando una ultracentrífuga analítica modelo XL-A (Beckman-Coulter Inc.), equipada con un sistema óptico de detección UV-VIS y un rotor An60Ti.

7.4.1. Velocidad de Sedimentación

El volumen de cada muestra fue de 400 μl y se aplicó un campo centrífugo de 48.000 rpm, a una temperatura de 20°C. En estas condiciones se desprecia la fuerza de difusión y se pudo estimar el coeficiente de sedimentación de MobMN199. Para ello se utilizó el programa SEDFIT, aplicando un modelo de mínimos cuadrados basado en el método de la distribución del coeficiente de sedimentación. El coeficiente de sedimentación se corrigió para las condiciones estándar usando el programa SEDNTERP, con lo que se obtuvo el correspondiente valor de $S_{20,w}$. El valor del coeficiente de fricción traslacional de MobMN199 (f) se determinó a partir de la masa molecular y del coeficiente de sedimentación de la proteína, mientras que el coeficiente de fricción de la esfera hidratada equivalente (f_0) se estimó usando una hidratación de 0,4506 g de agua por g de proteína. Con estos valores se pudo calcular la relación de fricción traslacional (f/f_0), que proporcionó una estimación sobre la forma de la proteína.

7.4.2. Equilibrio de Sedimentación

Las muestras (80 μ l) se centrifugaron a dos velocidades sucesivas (20.000 y 35.000 rpm), a una temperatura de 20°C. En estas condiciones, las fuerzas opuestas de centrifugación y difusión tienden a igualarse (condición de equilibrio), lo cual depende únicamente de la masa molecular de la especie que sedimenta. Las lecturas de absorbancia se realizaron a la longitud de onda más apropiada (230, 280 y 290 nm), dependiendo de la concentración de proteína, en intervalos de 3 h para determinar que las muestras habían alcanzado el equilibrio. El cálculo de la masa molecular aparente ($M_{w,a}$) de MobMN199 se realizó mediante el ajuste de los datos experimentales usando el programa HeteroAnalysis. El volumen específico parcial de MobMN199 fue 0.723 ml/g, calculado desde su composición en aminoácidos con el programa SEDNTERP.

7.5. Medida de masas moleculares por MALDI-TOF

Para el análisis comparativo de masa molecular entre MobMN199 y MobMN199 con Se-Met se empleó el espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex III (Bruker) del Servicio de Proteómica del CIB. Dado que la presencia de NaCl y glicerol podían interferir en los ensayos, las muestras de proteína pura (50 μ g) se precipitaron frente a un 10% de TCA durante 1 hora a 0°C. Tras centrifugar 10 min a 12.000 rpm, el precipitado se resuspendió en 20 μ l de tampón MT. Posteriormente se analizaron las muestras en el espectrómetro, previamente calibrado en el rango de 8000 a 30000 Da. La eficiencia de incorporación de Se-Met en MobMN199 con el protocolo aplicado (ver apartado 6.3) fue del 100% (9 residuos totales).

7.6. 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 MobM, MobMN199 y MobMN243 se llevó a cabo con diferentes programas bioinformáticos, tales como PSIPRED, Jpred, SABLE, NPS@, y PredictProtein, accesibles a través de la página web www.expasy.ch. Desde el resultado obtenido con cada uno de los análisis, se calculó el contenido medio de los residuos implicados en hélice- α , cadena- β o estructuras desordenadas.

7.7. Análisis de dicroísmo circular

7.7.1. Determinación espectroscópica

El espectro de dicroísmo de MobMN199 se adquirió con un espectropolarímetro JASCO J-810 equipado con un controlador de temperatura tipo “peltier”. La proteína purificada se equilibró por diálisis en el tampón CD1 (20 mM Hepes pH 7.6, 50 mM sulfato amónico; Tabla 6), y se diluyó en este mismo tampón a una concentración de 15 μ M. Para la adquisición del espectro en el UV lejano se emplearon cubetas de cuarzo con un paso óptico de 0,2 o 1 mm, en un rango de longitud de onda de 185 a 260 nm a una temperatura de 10°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 s. Los valores de elipticidad a cada longitud de onda se expresaron como elipticidad molar por residuo (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.

Para obtener información estructural, se analizaron los datos de CD en el UV lejano con dos programas diferentes: CONTIN, que implementa el algoritmo de regresión “ridge” de Provencher y Glockner (Provencher & Glöckner, 1981); y SELCON, que incorpora un método auto-consistente junto con un algoritmo de descomposición de valores únicos para asignar estructuras secundarias de proteínas (Sreerama & Woody, 2000).

7.7.2. Análisis de la estabilidad térmica

Mediante CD también se analizaron los cambios inducidos en la estructura de MobMN199 por el incremento de temperatura desde 10°C hasta 95°C a una tasa de 50°C/hora. Las muestras de proteína se dializaron frente a tampón CD2 (Tabla 6). Los cambios en la elipticidad se registraron a una longitud de onda de 218 nm, en cubetas de 0.1 cm de paso óptico, empleando la misma concentración de proteína que en el análisis del espectro de CD. Además, se recogieron espectros en un rango de 205 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 del análisis (10°C) y se recogió otro espectro en el mismo rango de longitudes de onda. Los datos se representaron gráficamente con el programa SigmaPlot v9.0.

7.8. Calorimetría isotérmica de valoración (ITC)

Las medidas de calorimetría isotérmica de valoración (ITC) se llevaron a cabo con un calorímetro VP-ITC (MicroCal), en el laboratorio de la Dra. Margarita Menéndez. Este equipo es capaz de medir el desprendimiento de calor al añadir cantidades crecientes de ion metálico (ligando) a una disolución de proteína. Una muestra de proteína MobMN199 concentrada (5 mg/ml) se dializó tres veces frente a tampón ITC (Tabla 6). A su vez, el tampón correspondiente al último cambio de diálisis se utilizó para preparar una solución de $MnCl_2$ (1 mM). En cada medida se cargaron 2 ml de proteína en la cámara del calorímetro y se realizaron inyecciones sucesivas de catión, cuyo volumen varió entre 3 y 15 μ l, en intervalos de 400 s hasta que se alcanzó la saturación. Durante todo el proceso se mantuvo una temperatura de 17°C y se aplicó una agitación constante (350 rpm) para asegurar una mezcla homogénea de los componentes de la reacción. Después de realizar una corrección con el control de dilución (repetición del ensayo pero sin proteína), los datos se ajustaron mediante una regresión no lineal a una ecuación de equilibrio de unión usando el programa Origin (MicroCal). Ello permitió el cálculo de la constante de asociación (K_b), la diferencia de entalpía (ΔH) y la estequiometría de unión (n) (Wiseman *et al.*, 1989).

8. INTERACCIONES DNA-PROTEÍNA

8.1. Visualización de complejos nucleoproteicos por microscopía electrónica

8.1.1. Complejos entre MobM y pMV158

La visualización de complejos se llevó a cabo mediante incubación de 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 MobM-pMV158 con la enzima de restricción *Stu*I. Para separar los complejos MobM-pMV158 de la proteína MobM libre y de la enzima de restricción, se utilizaron columnas de Sepharosa 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. La longitud del contorno de los complejos DNA-MobM lineales y la distancia del sitio de unión de MobM a uno de los extremos de la molécula de DNA se midieron usando un digitalizador LM4 (Brühl).

8.1.2. Complejos entre RNA polimerasa y el promotor del gen *mobM*

En este caso, se emplearon fragmentos de DNA lineal que contenían la región promotora del gen *mobM*, y se incubaron con la RNAP de *E. coli* (Epicentre) durante 15 minutos a 37°C, en el tampón del enzima. Tanto la fijación de los complejos RNAP-DNA con glutaraldehído como la preparación de las muestras para su visualización al microscopio electrónico, se llevó a cabo como se describe en el apartado anterior.

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

La actividad de MobM sobre DNA bicatenario (superenrollado) o monocatenario ha sido caracterizada previamente en nuestro laboratorio (Guzmán & Espinosa, 1997; Grohmann *et al.*, 1999). Esto fue muy útil para analizar la capacidad de corte y cierre sobre DNA de pMV158 y oligonucleótidos que contenían la secuencia del *oriT*, tanto con MobM como con todas las proteínas mutantes purificadas.

8.2.1. DNA superenrollado

En estas reacciones se incubaron 45-200 ng de proteína con 300 ng de DNA plasmídico en 20 µl de tampón B (Tabla 6), que contenía una concentración de 15 mM de distintos cationes divalentes (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} o Ba^{2+}). Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 min a 30°C y se pararon por la adición de una solución STOP con proteinasa K (0.1mg/ml) y SDS (0.5 %), incubando 10 min a 37°C. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TBE y tinción con una solución de BrEt (1 µg/ml). Se tuvo en cuenta que las formas superenrolladas plasmídicas (FI) incorporan menos BrEt con respecto a las formas relajadas (FII) generadas por la actividad de endonucleasa de MobM y derivados. Cuando se quisieron separar la formas FI' se añadió BrEt tanto en el gel de agarosa como en el tampón, llevando a cabo la electroforesis en oscuridad.

8.2.2. DNA monocatenario

Para estos ensayos se utilizó como sustrato diferentes oligonucleótidos purificados que contenían la secuencia del *oriT* de pMV158 o parte de ella. En las reacciones se mantuvo la concentración de oligonucleótido constante, aumentando la cantidad de proteína en un volumen final de 20 μ l de tampón B. Las reacciones transcurrieron durante 30 min a 37°C, y se pararon por la adición de 200 mM de EDTA y 300 μ g/ml de proteinasa K. A continuación, los DNAs se precipitaron con etanol, y se disolvieron directamente en tampón de carga BXF para ser analizadas en un gel de PAA desnaturalizante, tal como se indica en el punto 3.2.2.

8.3. Cálculos estequiométricos

Las medidas estequiométricas han consistido en determinar el número de moléculas de proteína unidas a cada molécula de oligonucleótido. Para ello se empleó una mezcla del mismo oligonucleótido marcado y no marcado (1:100) de manera que la cantidad de DNA total fuera de 500 nM. La cantidad de proteína varió en un rango desde 50 nM hasta 2.5 μ M. Tras aplicar las muestras en geles nativos, se cuantificaron los complejos formados y se representaron estos datos frente a las relaciones molares proteína:DNA empleadas en cada una de las reacciones. Con la ayuda del programa SigmaPlot y mediante ajuste por regresión lineal, se estimó la estequiometría de unión a partir de la pendiente de la recta.

8.4. Análisis y medidas de afinidad

La capacidad de unión de la proteína MobM o mutantes derivados de MobM se analizó tanto con DNA bicatenario lineal (dsDNA) como con DNA monocatenario (oligonucleótidos) mediante ensayos de movilidad diferencial en geles nativos (EMSA). Con esta técnica también se analizó la interacción entre dsDNA y la RNA polimerasa de *E. coli*.

En general, las reacciones de unión a DNA bicatenario se realizaron en 10 μ l de tampón A, con diferentes concentraciones de la proteína y del DNA en estudio, variando la cantidad de NaCl entre 50 y 300 mM. Tras incubar durante 15-30 min a 25-37°C, los complejos DNA-proteína se trataron con concentraciones variables de competidor inespecífico (heparina o poli-(dIdC)), durante 5 min más a la misma temperatura. Cuando este tratamiento no fue necesario, se añadió tampón de carga directamente a las muestras y los complejos se resolvieron mediante electroforesis en geles nativos de PAA al 5-12% en tampón TBE 1x, a 4 o 25°C. Los geles se tiñeron con una solución de BrEt (0.5 μ g/ml) durante 30 min y se visualizaron con un

transiluminador GelDoc XR (BioRad). En los EMSA con oligonucleótidos, en algunos casos el DNA estaba marcado radiactivamente con ^{32}P , y en otros con el fluoróforo Cy5 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 448/468 nm). En el primer caso, que la detección se realizó mediante el sistema Phosphorimager (Fuji), secando previamente los geles, y en el segundo se empleó un escáner Typhoon 9410 (Molecular Dynamics). El DNA libre y los complejos DNA-proteína se cuantificaron con la ayuda del programa Qone (BioRad), y las constantes de disociación (K_d) se calcularon ajustando los datos mediante regresión no lineal con el programa SigmaPlot, a partir de la siguiente fórmula:

$$y = \frac{B_{\text{max}} \cdot x}{K_d + x}$$

donde, “y” es el porcentaje de complejo Proteína-DNA formado, B_{max} es el valor porcentual máximo de “y”, y “x” es la concentración de proteína.

8.5. Ensayos de competición

8.5.1. Movilidad diferencial en geles nativos (EMSA)

En todos los casos, las reacciones contenían una concentración fija de proteína (80nM) y de DNA marcado (2nM) en tampón A 300mM NaCl. En las mezclas de reacción se añadió el DNA marcado con cantidades crecientes de un oligonucleótido no marcado, que contenía la misma secuencia que el primero u otra diferente. Después, se añadió la proteína y se incubó durante 20 min a 24°C. Tras este tiempo, se añadió tampón BXGE y se aplicaron las muestras en geles nativos de PAA.

8.5.2. Cinética de disociación

Tras mezclar MobMN199 (80 mM) con el oligonucleótido IR3-Cy5 (4nM) en 2 ml de tampón A 300 mM NaCl, se incubó durante 10 min para asegurar que todo el DNA estuviera formando complejos con la proteína. Luego, se añadió un exceso de 100 veces de oligonucleótido no marcado (400nM) y se midieron los cambios en la intensidad total de fluorescencia cada 5 s con un espectrofluorímetro. La representación gráfica de los datos permitió calcular la tasa o velocidad de disociación de la proteína por el DNA marcado, aplicando un ajuste exponencial con el programa SigmaPlot.

8.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los análisis de calorimetría diferencial de barrido se realizaron en un microcalorímetro MCS (Microcal, Inc.), en el laboratorio de la Dra. Margarita Menéndez. El rango de temperatura de análisis fue de 4 a 80°C, a una tasa de 50°C/hora y a una presión constante de 2 atm. Las muestras de proteína y DNA se dializaron en tampón ITC (Tabla 6), y se diluyeron en el mismo tampón hasta una concentración final de 40 y 20 µM, respectivamente. El análisis de los datos se realizó con el programa Origin. Las medidas de capacidad calorífica se obtuvieron después de realizar una sustracción de la señal de la línea base con tampón.

8.7. *Footprinting* sobre DNA superenrollado

En los ensayos de *footprinting* se incubaron 2 µg de DNA de pMV158 con diferentes dosis de proteína MobM (0, 0.25, 0.5, 1 y 2 µM) en 45 µl de tampón A con 50 mM NaCl, durante 25 min a 24°C. A continuación, las muestras se trataron con distintos agentes modificadores: Dimetilsulfato (DMS), Permanganato potásico (KMnO₄) o DNasa I. Concretamente, se añadió 5 µl de DMS (30 mM) o KMnO₄ (5mM) durante 5 o 2 min, respectivamente. Cuando se empleó DNasa I como agente modificador, se añadió a la reacción una mezcla de 5 µl que contenía 0.5 U de enzima, 10 mM de MgCl₂ y 5 mM de CaCl₂, incubando durante 1 min a 24°C. Las reacciones de modificación se pararon con 50 µl (o 100 µl en el caso de la DNasa I) del tampón STOP correspondiente (Tabla 6) y se precipitó el DNA tras dos extracciones sucesivas con fenol:cloroformo (1:1). A continuación, 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), calentando a 65°C y dejando enfriar hasta alcanzar los 35°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, 10 min. Por último, se paró la reacción con tampón de carga BXF. Los nucleótidos metilados por DMS, oxidados por KMnO₄ o digeridos con 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. Debido al carácter tóxico del DMS (cancerígeno), se trabajó en una campana de extracción durante todo el proceso de manipulación de las muestras.

8.8. Técnicas de cristalización

Todas las cristalizaciones y la resolución de las estructuras fueron realizadas por el grupo del Prof. Miquel Coll, en el Instituto de Biología Estructural de Barcelona (CSIC).

La preparación de los complejos se llevó a cabo en tampón A con 300 mM de NaCl, añadiendo un exceso de DNA del 10% (oligonucleótido IR1+8) con respecto a la proteína MobMN199 (170 μ M). Posteriormente se procedió a la purificación mediante filtración en gel y las fracciones correspondientes al complejo se concentraron hasta 8.5 mg/ml. La búsqueda de las condiciones de cristalización se realizó con los kits comerciales de "Hampton Research": *Crystal Screen I*, *Crystal Screen II*, *Index*, *Natrix* y *Protein-DNA*, dispensando las gotas con el robot "Cartesian" (200 nl, en relación 1:1) e incubando las placas a 4°C. Al cabo de 15-20 días, se detectaron tres condiciones distintas de cristalización: i) 6-10% de PEG de pesos moleculares 1500, 3000 o 6000, y 0.1 M de acetato sódico pH 4.6; ii) 10% de isopropanol en presencia de 0.1 M de acetato sódico pH 4.6; y iii) 6-8% de PEG de pesos moleculares 1000, 4000 o 8000, y 0.1 M de acetato sódico pH 4.6. Estas condiciones se escalaron a un volumen mayor en placas de 24 pocillos (1 μ l de proteína + 1 μ l de precipitante), incubando a 4°C. Después de 30-45 días, los cristales (Fig. 23) se prepararon para recogida de los datos de difracción congelándolos en nitrógeno líquido, utilizando 25% de glicerol como agente crio-protector. La colección de datos se realizó en la línea ID14-eh4 del ESRF. La estructura fue resuelta por el método de SAD (Dispersión Anómala Simple) utilizando la dispersión anómala del átomo de selenio. Las posiciones de siete de los ocho átomos de selenio se encontraron con el programa SHELXD y el primer mapa de densidad electrónica experimental se obtuvo a partir de las fases experimentales, previa modificación de la densidad (density modification) con el programa PIRATE. El programa RESOLVE permitió construir de manera automática el 30% de la estructura y el 70% restante fue trazado manualmente con el programa Coot.

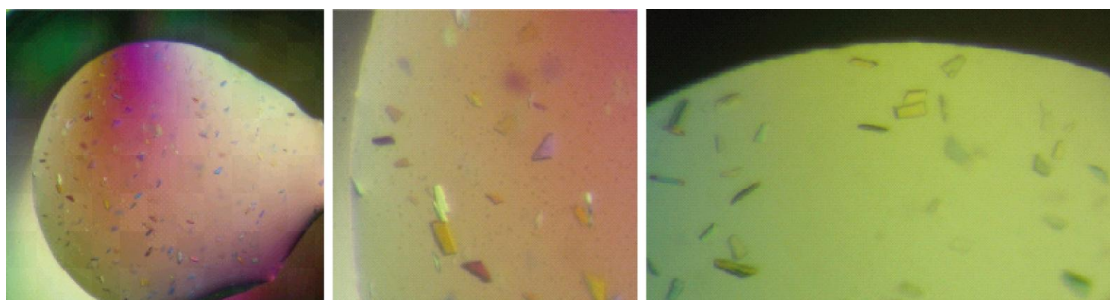


Figura 23. Cristales del complejo MobMN199 con el oligonucleótido IR1+8.
Cedido por Russi, 2009.

9. ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA PLASMÍDICA

La cepa *S. pneumoniae* 708, portadora del plásmido pAMβ1, se transformó con DNA de pMV158 o derivados, y se usó como cepa donadora en los experimentos de conjugación en filtro. La cepa *S. pneumoniae* MP517 se transformó con un fragmento de DNA lineal que contenía el operón *mal*, resultando la cepa *S. pneumoniae* MP3008. Esta última y la cepa *E. faecalis* OG1RF actuaron respectivamente como cepas receptoras en los ensayos de conjugación intra- e inter-específica.

9.1. Ensayo convencional de conjugación en filtro

Los ensayos de conjugación de pMV158 y sus derivados se realizaron según lo descrito anteriormente (Smith *et al.*, 1980; Priebe & Lacks, 1989), con algunas modificaciones. En resumen, las cepas donadoras y receptoras se crecieron con (para enterococos) o sin (pneumococos) aireación hasta que alcanzaron una concentración de 5×10^8 cells/ml, y tras centrifugar se resuspendió el pellet en una solución que contenía medio AGCH, 10 mM MgCl₂ y 2mg/ml de BSA. Ambas soluciones se mezclaron con una relación 1:5 (donador:receptor) en un volumen final de 2 ml y se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.22 μm (Millipore), colocándolo -con la cara que contenía las células hacia abajo- sobre otro filtro en una placa de AGCH-agar, suplementado con MgCl₂ (10 mM), BSA (2mg/ml) y glucosa (0.2%). La superficie del filtro superior se recubrió con 1ml de 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 enérgica durante 20 s. Las células transconjugantes se seleccionaron en medio AGCH con Tc (1 μg/ml), Nov (10 μg/ml) y 0.3% maltosa para el receptor *S. pneumoniae* MP3008 o en placas ESTY con Tc (4 μg/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.

9.2. Ensayos de conjugación en placas multipocillo

Para esta parte del trabajo, se utilizaron dos cepas donadoras *S. pneumoniae*, ambas portadoras del plásmido auxiliar pAMβ1, una de ellas con pMV158 (estirpe 708) y otra con pMV158GFP (estirpe R61), un derivado que conserva la capacidad de transferencia y que porta el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control

del promotor P_M del gen *malM* (Nieto & Espinosa, 2003), inducible positivamente por maltosa (o reprimido con sacarosa) en un fondo genético *malR*⁺ (Nieto *et al.*, 2000). En los ensayos intra-específicos, la cepa receptora fue *S. pneumoniae* MP3008. Por otro lado, la cepa *Enterococcus faecalis* OG1RF actuó como recipiente en todos los ensayos de conjugación inter-específica, en la que la expresión del gen *gfp* es constitutiva independientemente de la fuente de carbono utilizado como sustrato, ya que carece de un análogo de la proteína MalR de *S. pneumoniae*. El medio y las condiciones de cultivo empleadas han sido descritas previamente (Lacks *et al.*, 1986). En resumen, las estirpes se crecieron sin aireación en medio AGCH con 0.2% extracto de levadura y 0.8% sacarosa, suplementado con los antibióticos correspondientes para seleccionar las cepas donadoras (Tc, 1 µg/ml y Em, 1 µg/ml) o la cepa recipiente (Rif, 25 µg/ml). Cuando los cultivos alcanzaron una concentración de 5×10^8 células/ml, se centrifugó y se resuspendió el sedimento celular en el mismo volumen de medio de conjugación (MC = AGCH, 10 mM MgCl₂ y 2mg/ml de BSA y 100 µg/ml DNasa I). Con la ayuda de una pipeta multicanal añadimos 25, 50, 100 o 200 µl de la cepa donadora en los 8 pocillos de cada columna de una placa multipocillo estéril (8 filas x 12 columnas), cuya base contiene un filtro de 0.22 µm (MultiScreen HTS, GV con filtro Durapore estéril, Millipore). Este sistema nos permitió depositar las células sobre los filtros simplemente aplicando vacío (con la precaución de no sobrepasar los -10 in.Hg de presión para no dañar la membrana). A continuación, se añadió 100 µl de la cepa receptora en las columnas correspondientes, se filtró, se colocó la placa sobre una base de medio de conjugación sólido (MC + 1% agar) y se incubó a 37°C durante 4 horas. Posteriormente, para permitir la recuperación (repoblación) del plásmido en las células transconjugantes, se añadió 200 µl de medio AGCH con 0.2% extracto de levadura y 2% sacarosa o maltosa, suplementado con Nov (10 µg/ml) o Rif (25 µg/ml) para los ensayos de transferencia intra- o inter-específica, respectivamente, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Luego, se filtró nuevamente y se seleccionaron exclusivamente las células transconjugantes mediante resuspensión en 200 µl de un medio con la misma composición al anterior al que se añadió Tc (4 µg/ml). En el resto de las columnas se añadió 200 µl de medio AGCH con 0.2% extracto de levadura y 2% sacarosa o maltosa. En estas condiciones hay inducción de la expresión del gen *gfp* en las células de *E. faecalis* que han recibido el plásmido, mientras que se mantiene inhibida en las células donadoras de *S. pneumoniae*. Transcurridas 9 horas de incubación a 37°C, se eliminó el medio por filtrado y se resuspendió en 200 µl de PBS (pH 7.2). El cálculo de la eficiencia de transferencia se realizó mediante diluciones seriadas y siembra en placa seleccionando para los marcadores arriba mencionados. A su vez, se determinó el número de células/ml de donador y receptor

siguiendo el mismo procedimiento que para los transconjugantes con la excepción de que no se seleccionó para resistencia a tetraciclina. Tras incubar 24-48 horas a 37°C, la frecuencia de movilización conjugativa se calculó como el n° de células transconjugantes/ml dividido por el n° de células de donador/ml o receptor/ml.

10. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS PLASMÍDICAS Y ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE ssDNA

A partir de cultivos líquidos de las colonias transconjugantes se determinó el número de copias plasmídicas y se analizó la cantidad acumulada de intermediarios monocatenarios de DNA (ssDNA). Se prepararon extractos crudos a partir de cultivos que contenían los plásmidos de interés y se cargó un volumen de 50 µl en geles de agarosa al 0.7%, en tampón TBE con 0.5 µg/ml de BrEt (del Solar *et al.*, 1987a). Después de la electroforesis, el número de copias se determinó por densitometría con la ayuda del sistema transiluminador Gel-Doc y el software QuantityOne (BioRad). Dado que el grupo planar del BrEt se intercala en mayor grado en las formas lineales o relajadas (OC) del DNA que en su forma superenrollada (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 por equivalente cromosómico (n) se calculó a partir de la ecuación:

$$n = \frac{(Dp_1 \times 1.36) \times Dp_2 \times Mc}{Dc \times Mp}$$

donde, Dp_1 y Dp_2 son los valores determinados por densitometría para la banda correspondiente a las formas plasmídicas CCC y OC, respectivamente; Mc es el tamaño del DNA cromosómico, estimado en 3×10^6 pb para las especies bacterianas en estudio; Dc es el valor determinado por densitometría para la banda correspondiente al DNA cromosómico; y Mp es el tamaño del DNA plasmídico en pb.

Posteriormente, los mismos geles se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche) en condiciones desnaturalizantes según lo publicado (te Riele *et al.*, 1986, del Solar *et al.*, 1987a). Las membranas se hibridaron con una sonda, marcada radiactivamente con ^{32}P por PCR con la pareja de cebadores Cop-F/Cop-R (coordenadas 609 a 924 en la secuencia de pMV158), en un tampón comercial que aporta baja señal de fondo (ULTRAhyb, Ambion). Las cantidades de ssDNA y dsDNA se estimaron con ayuda del sistema Phosphorimager (Fuji) y el software QuantityOne (BioRad).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *mobM*

La iniciación de la transcripción en bacterias es un proceso complejo en el que se pueden distinguir varias etapas. En primer lugar, la RNAP interacciona con el promotor por una sola cara de la doble hélice de DNA, desde las posiciones -55 a -5. Seguidamente, los contactos de la proteína con el DNA se extienden corriente abajo del sitio de iniciación (+1), protegiendo desde la posición -55 a +20. El siguiente paso implica la apertura de la doble hélice del DNA (complejo abierto) en una región que llega a abarcar unos 10-15 pb (aproximadamente entre las posiciones -12 y +2), de manera que la RNAP comienza a incorporar y enlazar nucleótidos, formándose un complejo ternario de iniciación (DNA-RNAP-RNA). Finalmente, la subunidad σ se libera del holoenzima, se pierden los contactos específicos que la RNAP tenía con el promotor y se genera el complejo de elongación. La iniciación de la transcripción está regulada mediante la acción de factores proteicos en cualquiera de estas etapas. La represión transcripcional puede deberse a que la unión de un represor a su DNA operador impida el acceso directo de la RNAP a la región promotora (exclusión estérica) o bien porque, aunque haya unión de la RNAP, se anula la formación del complejo abierto o la elongación en la síntesis del RNA (Browning & Busby, 2004; Minchin & Busby, 2009).

En el DNA de pMV158 se han identificado cinco regiones promotoras (del Solar *et al.*, 1998). La expresión de los genes situados bajo el control del promotor P_{cr} da lugar a un mRNA bicistrónico para la síntesis de dos proteínas, CopG y RepB, implicadas en el control del número de copias plasmídicas y en la replicación, respectivamente. Otros dos promotores, P_I y P_{ctl} , dirigen la síntesis de dos RNAs de pequeño tamaño denominados RNA I y RNA II, respectivamente. Mientras que actualmente se desconoce la función del RNA I, existen varios trabajos en los que se demuestra que, junto a CopG, el RNA II es uno de los elementos implicados en el circuito regulador del número de copias de pMV158 (del Solar & Espinosa, 2000). El promotor P_{tet} dirige la expresión de la proteína Tet(L), responsable de la resistencia a tetraciclina. Y, finalmente, como objeto de estudio de este capítulo, el promotor P_{mob} dirige la síntesis de la proteína iniciadora de la conjugación desde el gen *mobM*. En este trabajo, se ha estudiado la unión de RNAP a P_{mob} , el inicio de la transcripción *in vivo* e *in vitro* del gen *mobM* en *E. coli*. Además, también se ha definido el punto de iniciación de transcripción en *S. pneumoniae*, *in vivo*. La realización de estudios de interacción DNA-proteína por microscopía electrónica se realizó a través de la Dra. Alicia Bravo en el laboratorio del Dr. Rudi Lurz, en el Instituto de Genética Molecular Max-Planck (Berlín, Alemania).

1.1. Análisis de la interacción entre el promotor de *mobM* y la RNAP

En un trabajo previo se ha caracterizado el inicio de la transcripción del gen *mobM* en la bacteria G+ *Lactococcus lactis* (Farías *et al.*, 1999). De acuerdo con este estudio, el promotor de *mobM* solapa con el origen de transferencia del plásmido pMV158 (ver Fig. 24). Sin embargo, dado que esta región de pMV158 se caracteriza por tener un alto contenido en A+T, la probabilidad de encontrar secuencias reconocidas por el factor σ^{70} y que se ajusten a la secuencia consenso de la caja -35 (5'-TTGACA-3') y, sobre todo, a la secuencia -10 (5'-TATAAT-3') es muy alta. Por ello, cabría la posibilidad de que la RNAP de otras bacterias reconociesen una secuencia diferente a la reconocida por la RNAP de *L. lactis*. Así, en una búsqueda de promotores mediante análisis bioinformático se identificó una posible secuencia promotora para la RNAP de *E. coli*. Dicho sitio se ubicaba 34 pb a 3' del sitio reconocido por la RNAP de *L. lactis* (Fig. 24), con las secuencias 5'-TgGAag-3' (-35) y 5'-TAaAcT-3' (-10) y un espaciado de 17 bases entre ambas. Además, la secuencia adyacente hacia el extremo 5' de la caja -10 (5'-TGTGC-3') se ajusta perfectamente al consenso de promotor con -10 extendido (5'-TRTGN-3', donde R es una purina y N es cualquier nucleótido; Browning & Busby, 2004).

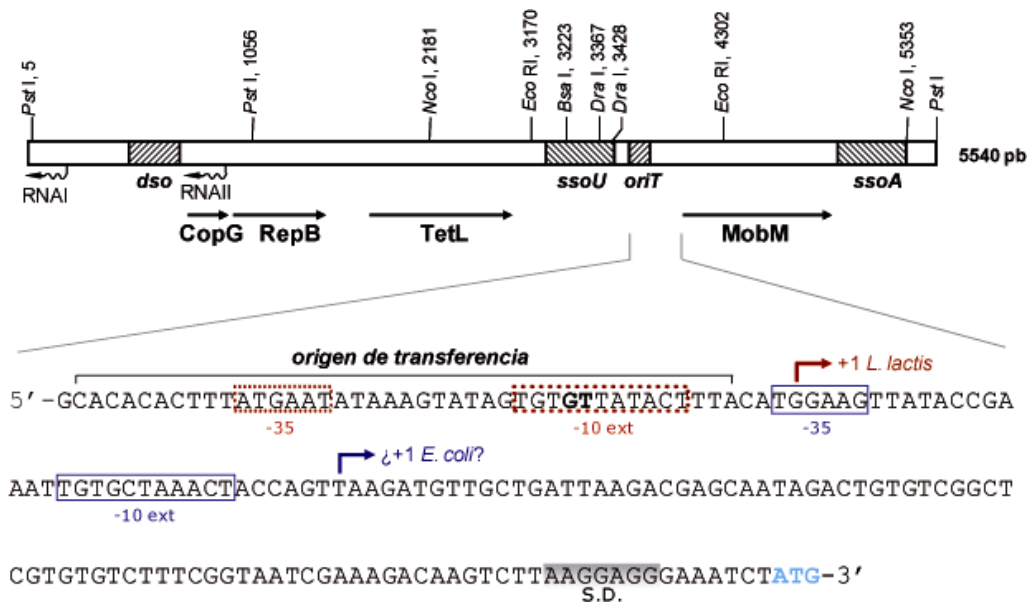


Figura 24. Región promotora del gen *mobM* de pMV158.

Se muestra la secuencia promotora del gen *mobM*, la cual solapa parcialmente con el origen de transferencia (*oriT*). Dentro de la caja -10 descrita para el promotor reconocido por *L. lactis* (punteado rojo) se ubica el dinucleótido 5'-GpT-3' (en negrita) donde corta la proteína MobM. En azul se indica un segundo posible promotor, hallado mediante predicción bioinformática en base a promotores regulados por σ^{70} descritos en *E. coli*. En el extremo 3' se indica el posible sitio de unión de los ribosomas (secuencia de Shine Dalgarno, S.D.) y el codón ATG de inicio de síntesis de la proteína MobM.

Para determinar si la RNAP de *E. coli* reconocía alguna de las secuencias mencionadas como promotor del gen *mobM*, se analizó la unión de una muestra comercial de holoenzima (Epicentre) a un fragmento de DNA bicatenario lineal (449 pb) que incluye ambas secuencias promotoras. Se optimizaron las condiciones del ensayo empleando diferentes relaciones DNA:RNAP y variando la concentración de heparina (que se usó como competidor). Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C, condiciones en las que la formación del complejo abierto (RP_o) durante el inicio de la transcripción está favorecida y es estable. Como se muestra en la Figura 25, se observó que los complejos DNA:RNAP quedaban retenidos en los pocillos en ausencia de heparina. Sin embargo, mediante la adición de heparina a una concentración de 5 µg/ml se consiguieron resolver complejos específicos entre el DNA empleado y la RNAP de *E. coli*, llegando a desplazarse completamente cuando se aumentó la cantidad de este competidor.

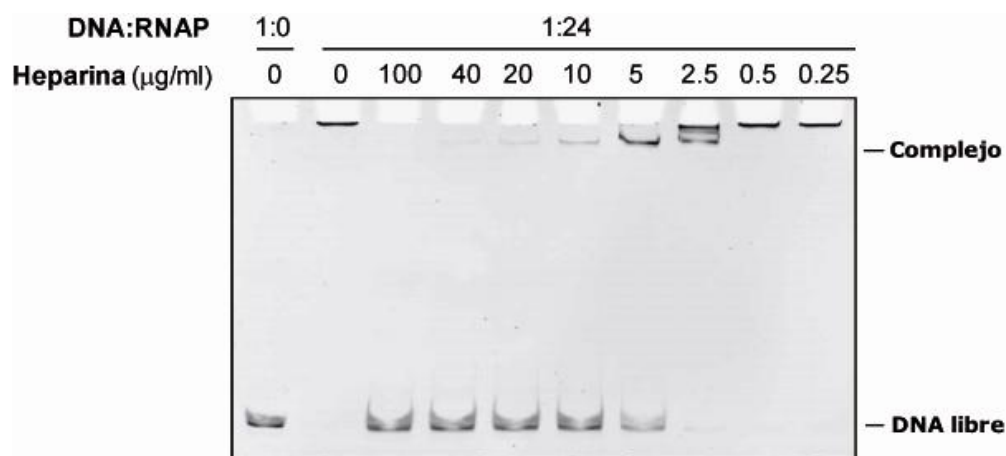


Figura 25. Resolución de complejos específicos formados entre la región promotora del gen *mobM* y la RNAP de *E. coli*.

La relación DNA:proteína (5:120 nM) se mantuvo constante (1:24), incubando a 37°C durante 30 min. Posteriormente se añadieron diferentes concentraciones de heparina (0.25-100 µg/ml) y, tras incubar otros 5 min a 37°C, se cargaron las reacciones en geles nativos de PAA (5%). La electroforesis se llevó a cabo a 4°C, durante 1.5 horas a 12 V/cm. El gel se tiñó con una solución de BrEt a 1 µg/ml, durante 20 min y se visualizó en un transiluminador con luz UV.

Para localizar qué secuencia reconoce la RNAP de *E. coli* como promotor del gen *mobM* se analizaron los complejos DNA:RNAP mediante microscopía electrónica, en condiciones similares a las empleadas para los ensayos de EMSA. En estos ensayos, se utilizaron dos fragmentos de DNA de 699 y 2375 pb. Ambos fragmentos fueron amplificados por PCR con las parejas de oligonucleótidos ssoU-F/ssoU-R y ssoU-F/ssoA-R, respectivamente (Tabla 5). En los complejos DNA:RNAP visualizados

al ME, se midió la longitud entre el sitio de unión de la RNAP y el extremo de la molécula de DNA que está próximo a dicho sitio.

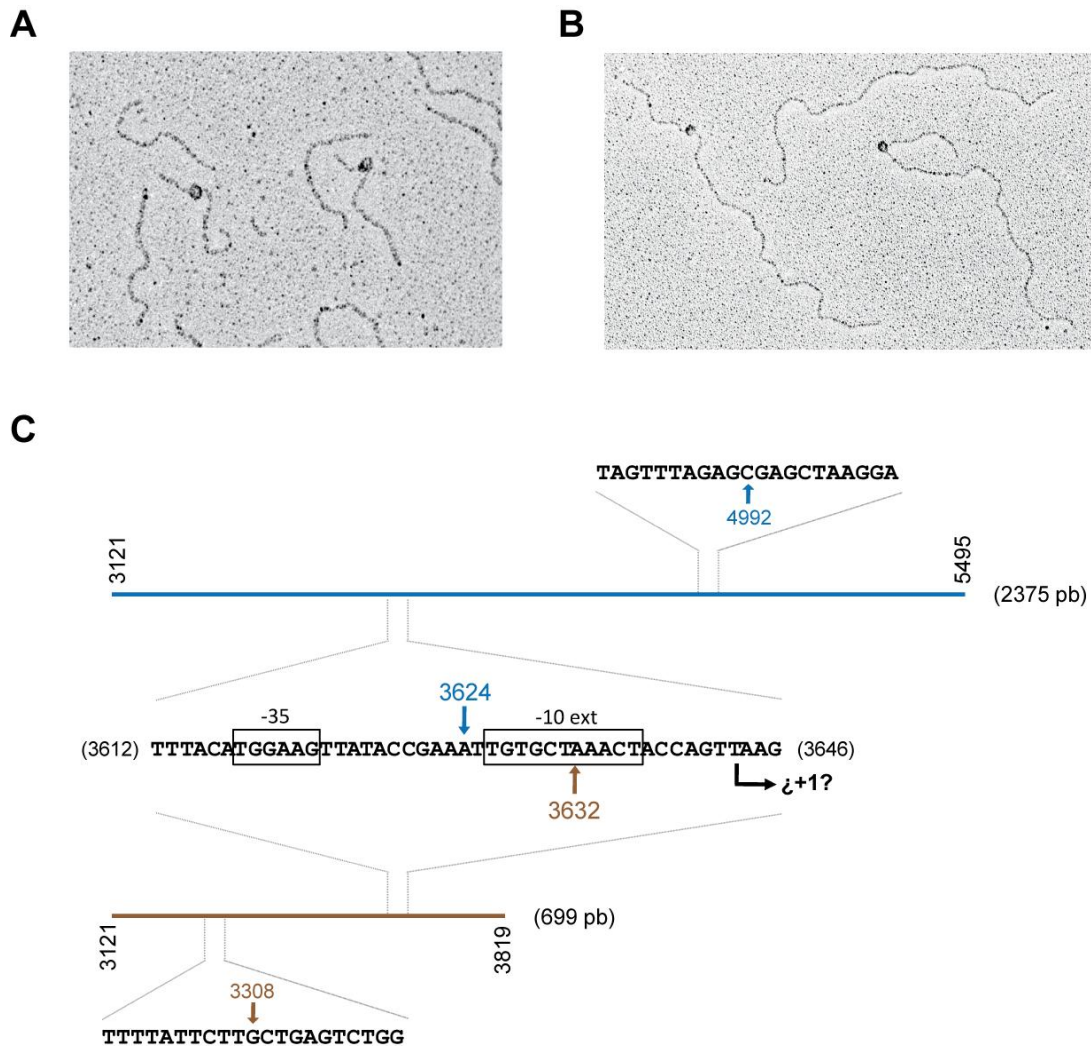


Figura 26. Mapeo del sitio de unión de la RNAP de *E. coli* en la región promotora del gen *mobM* por microscopía electrónica.

Micrografías de los complejos formados entre la RNAP y dos fragmentos de DNA de 699 pb (**A**) o 2375 pb (**B**). Ambos fragmentos contienen la región promotora del gen *mobM*. Tras fijar los complejos RNAP-DNA con glutaraldehído, se procedió a la preparación de las muestras para su observación al microscopio electrónico. Posteriormente, se midió la longitud del DNA en los complejos y, la distancia entre el sitio de unión de la RNAP y el extremo del DNA más próximo. **C**) Esquema ilustrativo de los dos fragmentos de DNA empleados, uno de 2375 pb (en azul) y otro de 699 pb (en marrón). Se indican las coordenadas de pMV158 (flechas azules y marrones) en las que podría localizarse la RNAP de acuerdo con las mediciones.

Con el fragmento de 699 pb, de 105 complejos analizados, el 75.24% tenían una molécula de RNAP localizada a aproximadamente 187 pb del extremo. Dicha posición correspondería a la coordenada 3308 ó 3632 de pMV158 (ver Figura 26). Los

resultados obtenidos con el fragmento de 2375 pb nos permitieron concluir sobre el sitio de unión de la RNAP. En este caso, el 73.56% de los complejos analizados (un total de 174) tenían una molécula de RNAP a aproximadamente 503 pb del extremo. Dicha posición correspondería a la coordenada 3624 ó 4992 de pMV158. Tras analizar nuevamente las regiones correspondientes a las coordenadas 3308 y 4992 de pMV158, no se observaron secuencias que se ajustaran a un promotor consenso (Fig. 26). Sin embargo, aparte de que las coordenadas 3632 (DNA de 699 pb) y 3624 (DNA de 2375 pb) se ajustan con bastante exactitud entre ellas, coinciden precisamente con la posición de la caja -10 propuesta para el promotor de *E. coli* mediante predicción bioinformática (ver Fig. 24). Estos datos sugerían que el promotor reconocido por la RNAP de *E. coli* es diferente al descrito para *L. lactis*. Por ello, a partir de ese momento se denominó como *Pmob1* al promotor reconocido en *L. lactis*, y como *Pmob2* al observado para *E. coli*.

1.2. Transcripción *in vitro* con la RNAP de *E. coli*

Una vez que se tenían a punto las condiciones de unión de la muestra comercial de la RNAP de *E. coli*, se quiso analizar si esta enzima tenía capacidad para iniciar la síntesis de mRNA desde el nuevo promotor identificado en el gen *mobM* (*Pmob2*). Para ello, se realizaron ensayos de transcripción *in vitro* empleando dos moldes de DNA (DNA-1 y DNA-2) de 362 pb y 699 pb de longitud, respectivamente (Fig. 27A). Ambos DNAs incluyen tanto el promotor *Pmob1* (*L. lactis*) como *Pmob2* (*E. coli*?).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27B. Teniendo en cuenta que el RNA migra más lentamente que un DNA de igual tamaño (entre un 5 y 10%), se estimaron los tamaños correspondientes a cada uno de los productos de síntesis observados tomando como referencia una secuencia de DNA obtenida por el método de Sanger. Se obtuvieron productos mayoritarios de 158 y 188 nt con el DNA-1 y DNA-2, respectivamente. Estos datos se ajustaron perfectamente a los tamaños teóricos esperados para el promotor *Pmob2* (148 y 177 nt), lo que equivale a un punto de inicio de transcripción en la coordenada 3643 de la secuencia de pMV158, distanciado 7 pb a 3' de la caja -10 de *Pmob2*. Así, se pudo afirmar de forma inequívoca que *Pmob2* es el promotor reconocido preferentemente por la RNAP de *E. coli*.

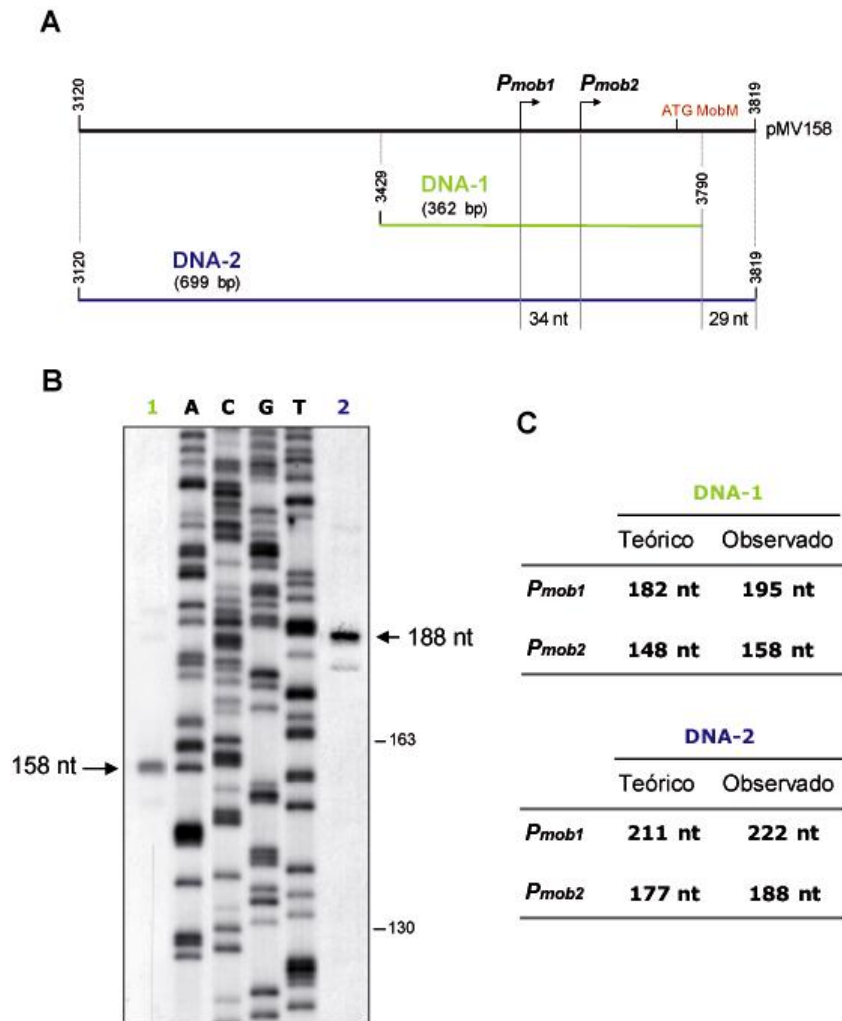


Figura 27. Transcripción *in vitro* con la RNAP de *E. coli*.

A) Esquema de los moldes de DNA-1 (verde) y DNA-2 (azul) empleados en el ensayo (362 y 699 pb, respectivamente), indicando las coordenadas correspondientes en la secuencia de pMV158. Ambos DNAs incluyen los promotores descritos para *L. lactis* (*Pmob1*) y *E. coli* (*Pmob2*), distanciados por 34 nucleótidos (nt) entre sí. **B)** Gel desnaturalizante (PAA 6%, 8M urea) con las muestras de mRNA sintetizado por la actividad de la RNAP, junto a reacciones de secuencia de DNA como referencia. Las reacciones se llevaron a cabo con 30nM de DNA, 0.15 U de RNAP, y una mezcla de rNTPs (incluido ^{32}P -UTP), incubando a 37 °C durante 30 min. Las flechas indican los tamaños aproximados de cada uno de los productos obtenidos. **C)** Comparación entre los tamaños del producto de mRNA teórico y observado para cada uno de los promotores y moldes de DNA empleados. La diferencia de tamaños se debe a que una molécula de RNA migra más lentamente (5-10%) que una molécula de DNA del mismo tamaño.

1.3. Determinación de la transcripción *in vivo* del gen *mobM*

Los intentos de purificación de la RNA polimerasa (RNAP) de *S. pneumoniae* en nuestro laboratorio han sido, por ahora, fallidos. Por esta razón, no fue posible analizar la capacidad de unión de esta proteína al DNA del *oriT* mediante EMSA, y tampoco el estudio del inicio de síntesis del mRNA_{mob} mediante transcripción *in vitro*.

**CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DEL DOMINIO RELAXASA
DE LA PROTEÍNA MobM**

El inicio de la transferencia conjugativa de pMV158 se debe a la actividad de la proteína MobM, codificada por el propio plásmido. Esta proteína produce un corte específico (actividad relaxasa) en el dinucleótido 5'GpT-3' de su DNA diana, el origen de transferencia (*oriT*), y como consecuencia, queda unida de manera estable (probablemente a través de un enlace covalente) al extremo 5' del propio plásmido (Guzmán & Espinosa, 1997). Por homología con otras proteínas de la familia Tra/Mob (Francia *et al.*, 2004), se asumió que el dominio relaxasa de MobM está localizado en la región N-terminal. Así, además de la proteína nativa, se planteó la producción de una versión truncada de MobM que contuviera la región N-terminal de forma aislada. Ello permitió llevar a cabo una primera aproximación de su caracterización estructural mediante dicroísmo circular y de sus características hidrodinámicas mediante ultracentrifugación analítica. Asimismo, se procedió al estudio de las propiedades catalíticas y termodinámicas de MobM en presencia de diferentes cationes divalentes. Una parte importante de este trabajo se realizó en el laboratorio de la Doctora Margarita Menéndez, en Instituto de Química-Física Rocasolano (IQFR-CSIC, Madrid).

2.1. Purificación del dominio relaxasa de la proteína MobM

La proteína MobM se ha purificado mediante el sistema pET combinado con la estirpe *E.coli* BL21(DE3). Se tuvieron en cuenta dos criterios para el diseño del clonaje y purificación el dominio relaxasa de MobM. En el primero, se consideró que todos los motivos conservados debían estar presentes en la versión truncada de la proteína (motivos I, II, y III). Y en el segundo, el nivel de conservación de secuencia de MobM con respecto las proteínas de la familia debía ser elevado. Así, dado que los tres motivos descritos se encuentran en los primeros 135 aminoácidos de la proteína (Fig. 29), y después del residuo en posición 200, la conservación de secuencia fue muy baja, se decidió clonar la región codificante de los primeros 199 aminoácidos de MobM (Fig. 29). Concretamente, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de 630 pb (coordenadas 3718-4347 en la secuencia de pMV158) con una pareja de cebadores que incluían: i) diana para la enzima de restricción *NdeI* (oligonucleótido Nde-For) y ii) diana para *XhoI* y el cambio del codón "GAA" del gen *mobM* (equivalente al residuo E200) por un codón STOP "TAA" (oligonucleótido STOP/*Xho*-Rev). Tras digerir el producto amplificado y el vector de expresión pET24(b) con las dos enzimas de restricción, se ligaron ambos fragmentos para obtener el plásmido recombinante pMobMN199, que contiene la región del gen *mobM* que codifica los primeros 199 aminoácidos de la región N-terminal. A su vez, se obtuvo el clonaje que permitió purificar una variante de esta proteína con una cola de 6 histidinas en el extremo C-

terminal (MobMN199His), empleando una pareja de cebadores similar, en la que no se incluía el codón STOP en el segundo oligonucleótido (Xho-Rev).

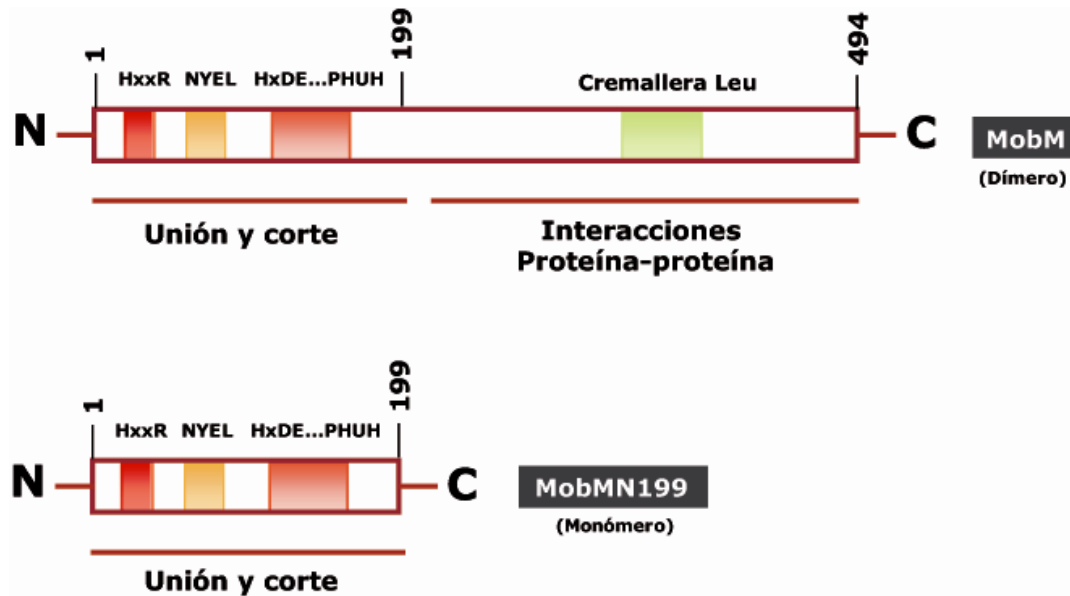


Figura 29. Esquema de la proteína MobM y MobMN199.

La región N-terminal contiene tres motivos conservados, en teoría implicados en la unión y corte del DNA. La región C-terminal contiene los dominios de dimerización y, supuestamente, de interacción con otras proteínas.

La expresión de proteína en estos vectores está dirigida bajo el control del promotor $\Phi 10$ del fago T7, reconocido específicamente por la RNA polimerasa (RNAP) de este mismo fago. Por ello, tras confirmar cada uno de los clonajes mediante secuenciación de DNA, se procedió a su introducción en la estirpe de *E. coli* BL21(DE3), cuyo cromosoma contiene integrada una copia defectiva del fago λ , con el gen de la RNAP de T7 bajo el promotor inducible *lacUV5*. En este sistema, la expresión de la proteína de interés se induce añadiendo IPTG al medio de cultivo, de manera que se inicia la síntesis de la T7-RNAP, encargada de transcribir el gen clonado en el vector pET (ver Fig. 22). La estrategia de purificación de MobM y MobMN199 en este trabajo se basó en una mejora de un protocolo previo, optimizado para MobM (de Antonio *et al.*, 2004), empleando PEI para precipitar DNA de forma eficiente, seguido de un paso de cromatografía de afinidad y un paso final de filtración en gel (ver Materiales y métodos). El rendimiento final obtenido fue de 4.5 mg de proteína por cada litro de cultivo de células inducido, con una pureza superior al 98% (Fig. 30).

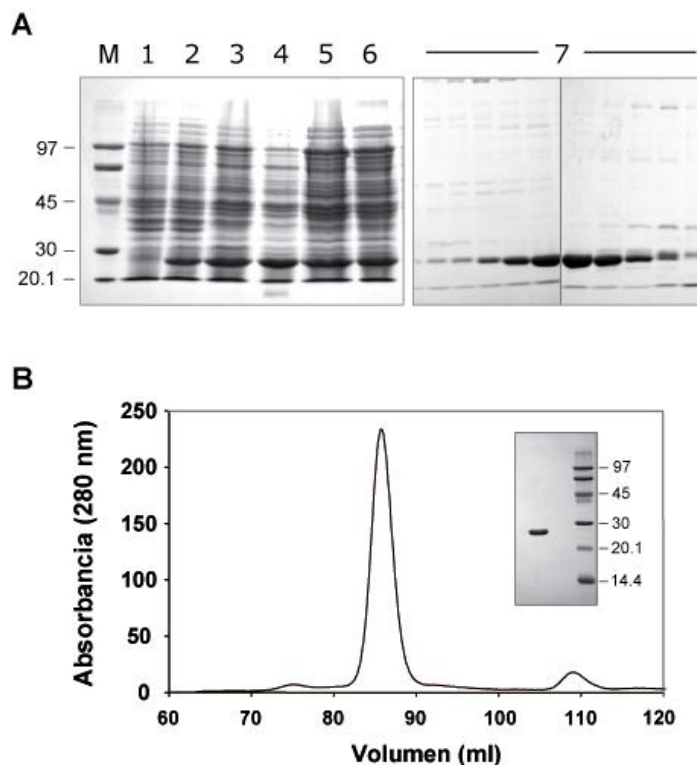


Figura 30. Pasos en la purificación de la proteína MobMN199.

A) Se partió de un cultivo a una DO_{600} de 0.5 (carril 1) para inducir la expresión de la proteína con 1mM de IPTG, durante 30 min a 37°C en agitación, seguido de 1'5 horas con 200 μ g/ml de rifampicina en las mismas condiciones (carril 2). Las células se lisaron mediante paso por una prensa French y el sobrenadante (carril 3) se trató con PEI al 0.2% (carril 4). La fracción proteica se precipitó con sulfato amónico al 70% de saturación y se resuspendió en tampón A 0.3 M NaCl (carril 5). Tras dializar frente al mismo tampón (carril 6), la muestra se cargó en una columna de heparina y se eluyó mediante un gradiente de 0.3 a 0.8 M de NaCl (carriles del gel 7). **B)** Último paso de purificación de MobMN199 mediante cromatografía de filtración en gel. El gráfico muestra el perfil de elución de MobMN199 en una columna Superdex 200 (Amersham), a un flujo de 0.5 ml/min. La imagen interior muestra el análisis SDS-PAGE de las fracciones puras y concentradas junto a un marcador de peso molecular.

En el caso de la proteína MobMN199His se aplicó un protocolo de cromatografía de afinidad en columnas de níquel inmovilizado (IMAC), empleando un tampón con alta fuerza iónica (1M NaCl) para evitar la unión inespecífica de DNA (no se muestra). La movilidad relativa de las proteínas MobMN199 y MobMN199His en geles desnaturizantes (SDS-PAGE) correspondió con lo esperado, según las predicciones de las masas moleculares teóricas realizadas a través de las secuencias de DNA (23261 y 24326 Da, respectivamente). La secuenciación de los primeros 10 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína MobMN199 reveló que, al igual que en la proteína MobM, el residuo Met1 era eliminado. Así, el coeficiente de extinción molar estimado fue $\epsilon = 17420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (lo cual equivale a $A_{280}^{0.1\%} = 0.753 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), debido al contenido en 1 residuo Trp y 8 residuos Tyr (4.5% del contenido

aminoacídico total). El punto isoeléctrico predicho fue de 6.2, un valor poco frecuente en proteínas de unión a DNA.

En cada uno de los pasos de la purificación de MobMN199 se tomaron alícuotas de 50 µl, para medir la cantidad de proteína total, considerando 1 unidad de absorbancia a 280 nm como 1mg de proteína por ml (Tabla 8). Como se esperaba, antes del tratamiento con PEI para eliminar el DNA del extracto crudo, las relaciones de absorbancia 260/280 fueron demasiado altas (1.72), de manera que la estimación cantidad de proteína total no fue fiable. A medida que se avanzó en el proceso de purificación, la cantidad de proteína total disminuyó y la relación 260/280 fue mejorando considerablemente (~ 0.5). Sólo tras la aplicación de la muestra en columna de heparina, se obtuvo una pureza relativa de MobMN199 lo suficientemente buena como para poder realizar ensayos de actividad de corte y cierre con DNA superenrollado de pMV158. Así, se definió como “Unidad enzimática” a la cantidad de proteína MobMN199 necesaria para convertir 0.5 µg de DNA superenrollado en formas circulares y cerradas covalentemente, incubando durante 1 hora a 37°C en presencia de MnCl₂ (15 mM). Según se indica en la Tabla 8, la actividad específica (unidades/mg proteína) aumentó 5 veces tras el último paso de purificación mediante filtración en gel. Fue imposible llevar a cabo este ensayo con las muestras obtenidas en los pasos anteriores, debido probablemente a la presencia de proteínas con actividad exo- o endo-nucleasa.

Tabla 8. Purificación de MobMN199 y medidas de actividad específica.

	Volumen (ml)	Proteína total (mg/ml) ^a	Relación 260/280	Unidades totales ^b	Actividad específica (unidades/mg)
Extracto crudo	37	52,9	1,72	N.D.	-
PEI	37	12,9	0,82	N.D.	-
Sulfato Amónico	36	8,4	0,78	N.D.	-
Diálisis	36	6,9	0,67	N.D.	-
Heparina	1,5	7,6	0,59	2410	212
Filtración en gel	2	4,4	0,53	11430	1298

^aEstimación de la concentración de proteína considerando 1 Abs₂₈₀= 1mg/ml.

^bUna unidad equivale a la cantidad de proteína necesaria para convertir 0.5 µg de DNA superenrollado en formas circulares y cerradas de forma covalente, incubando 1 hora a 37 °C. N.D., no determinado.

2.2. Estado de oligomerización de la proteína MobMN199

MobMN199 representa una versión truncada en la que se han eliminado los últimos 295 residuos de la proteína MobM desde el extremo carboxilo. Por esta razón, y dado que se ha determinado que la proteína MobM nativa es un dímero en solución (de Antonio *et al.*, 2004), se realizaron varios análisis de ultracentrifugación analítica con el fin de conocer el estado de oligomerización de la proteína MobMN199 (Fig. 31). Los resultados obtenidos con tres concentraciones de proteína (2, 8 y 20 μM) fueron muy similares entre sí. Los perfiles de velocidad de sedimentación se ajustaron a una sola especie, confirmando la pureza de la muestra (98.1% de la concentración total analizada), con un valor $S_{20,w}$ de 2.37 s y un $M_{w,a}$ de 22944 ± 2820 Da; lo cual corresponde con la masa teórica de un monómero de MobMN199 (23,130 Da, sin Met1). Además, los mejores ajustes de los datos de equilibrio de sedimentación a las tres concentraciones ensayadas fueron de 22637, 23101 y 21985 Da, respectivamente, confirmando que la proteína se encuentra en forma monomérica y que el dominio de dimerización se encuentra en la región C-terminal de la proteína MobM. El valor del radio friccional calculado fue $f/f_0=1.25$, indicando que MobMN199 tiene una forma asimétrica, alejado de una partícula esférica rígida ($f/f_0= 1.0$).

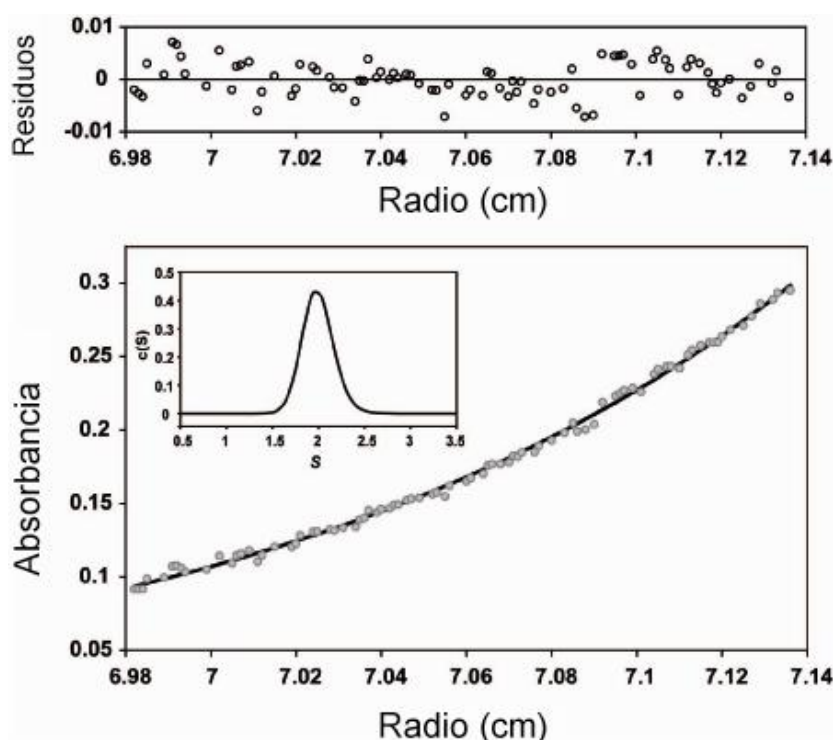


Figura 31. Perfil de ultracentrifugación analítica de MobMN199.

Equilibrio de sedimentación de la proteína (8 μM en tampón UA) a 35000 rpm y 20°C. El mejor ajuste (línea continua) de los datos experimentales (círculos grises) correspondía a un monómero de 23101 Da. El gráfico interior muestra la distribución de la muestra en el análisis de velocidad de sedimentación (48000 rpm, 20°C).

2.3. Análisis de la actividad relaxasa de MobMN199

La proteína MobM silvestre es capaz de convertir formas de DNA superenrollado circular covalentemente cerradas (formas FI o cccDNA) de pMV158 en círculos abiertos (formas FII, ocDNA) de manera proporcional a la dosis de enzima empleada. La actividad óptima de corte se alcanzó en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} , a una temperatura de 30 °C durante 30 min (de Antonio *et al.*, 2004). Para analizar la capacidad de corte de MobMN199 y MobMN199His sobre pMV158, se incubaron 300 ng de DNA superenrollado con diferentes concentraciones de proteína (rango de 120 a 480 nM) en presencia de $MnCl_2$ (15 mM), en las mismas condiciones que en los ensayos originales con MobM. El resultado indicó que MobMN199 tiene la misma eficiencia de corte que la proteína nativa, convirtiendo hasta casi un 60% de formas FI en formas FII (Fig. 32A).

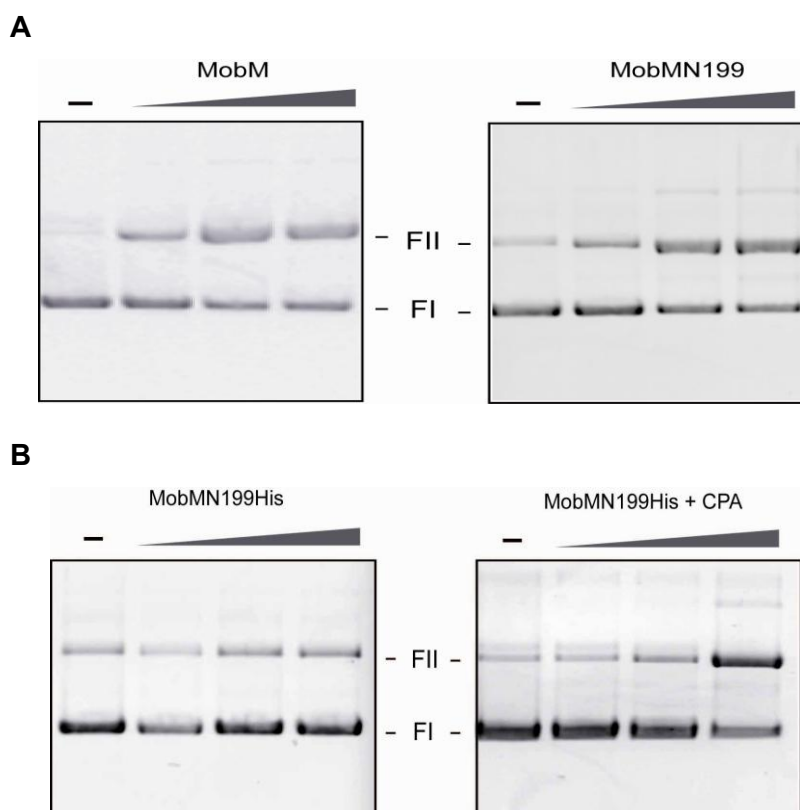


Figura 32. Actividad de corte de MobM, MobMN199 (A) y MobMN199His (B) sobre DNA superenrollado de pMV158.

En cada reacción se empleó una concentración de DNA de 8 nM y se incubó sin o con proteína (120, 240 o 480 nM) en presencia de $MnCl_2$ (15 mM) a 30 °C, 30 min. FI, DNA superenrollado; FII, DNA relajado por la actividad de corte de MobM o sus derivados; CPA, carboxipeptidasa-A.

En ninguno de los ensayos se observó una actividad de corte del 100%, lo cual es típico de las proteínas con actividad relaxasa, posiblemente debido a un equilibrio entre corte y cierre del DNA. Desafortunadamente, cuando estos ensayos se repitieron con la versión que tenía la cola de His (MobMN199His) no se obtuvieron formas FII, indicando que la proteína no era activa, ni siquiera aumentando su concentración (hasta 1 μ M). Esta versión de la proteína recuperó parcialmente la actividad cuando se eliminaron los residuos His mediante digestión controlada con Carboxipeptidasa A (Fig. 32B). Podría pensarse que este fenómeno es debido a que las His impiden un plegamiento correcto de la proteína, y/o a que el DNA no pueda acceder al sitio activo de la misma. Por ello, no se prosiguió en esta dirección solo se siguió trabajando con la versión truncada de la proteína en su estado nativo.

La actividad relaxasa de MobMN199 fue óptima cuando, en lugar de Mn^{2+} , se empleó $MgCl_2$. Sin embargo, esta actividad solo se recuperó de forma parcial cuando se realizaron los ensayos en presencia de $CaCl_2$, y fue nula con Zn^{2+} o Ba^{2+} (Fig. 33). Así, la jerarquía de preferencia de MobMN199 por diferentes cationes sería: $Mn^{2+} \geq Mg^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} \geq Ba^{2+}$. Estos resultados son idénticos a los obtenidos previamente con la proteína nativa MobM (de Antonio *et al.*, 2004).

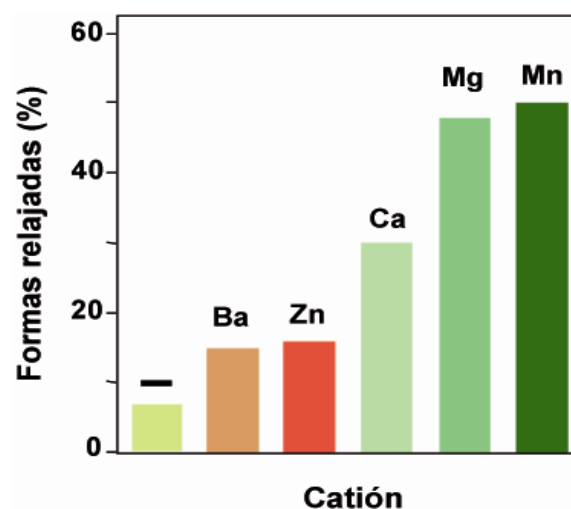


Figura 33. Actividad de corte de MobMN199 en presencia de diferentes cationes divalentes.

En las reacciones se empleó una concentración de DNA de 8 nM y se incubó sin o con proteína (240 nM) durante 30 min a 30°C, en presencia de diferentes cationes divalentes a una concentración de 15 mM.

2.4. Determinación de la estructura secundaria de MobMN199

La estructura secundaria de MobMN199 se ha analizado primero mediante métodos computacionales, y luego se contrastaron de forma experimental por análisis de dicroísmo circular. En primer lugar, se estimó (Tabla 9) y representó la distribución de los residuos (Fig. 34A) que contribuyen en la estructura secundaria de la proteína mediante análisis bioinformático con 5 programas de predicción diferentes (PSIPred, Jpred, NPS@, SABLE y PredictProtein). Como puede observarse, las hélices- α se alternan con las cadenas- β sobre la secuencia de la proteína MobMN199, lo cual es una característica típica del dominio relaxasa de las proteínas de la familia Rep/Mob (ver Introducción).

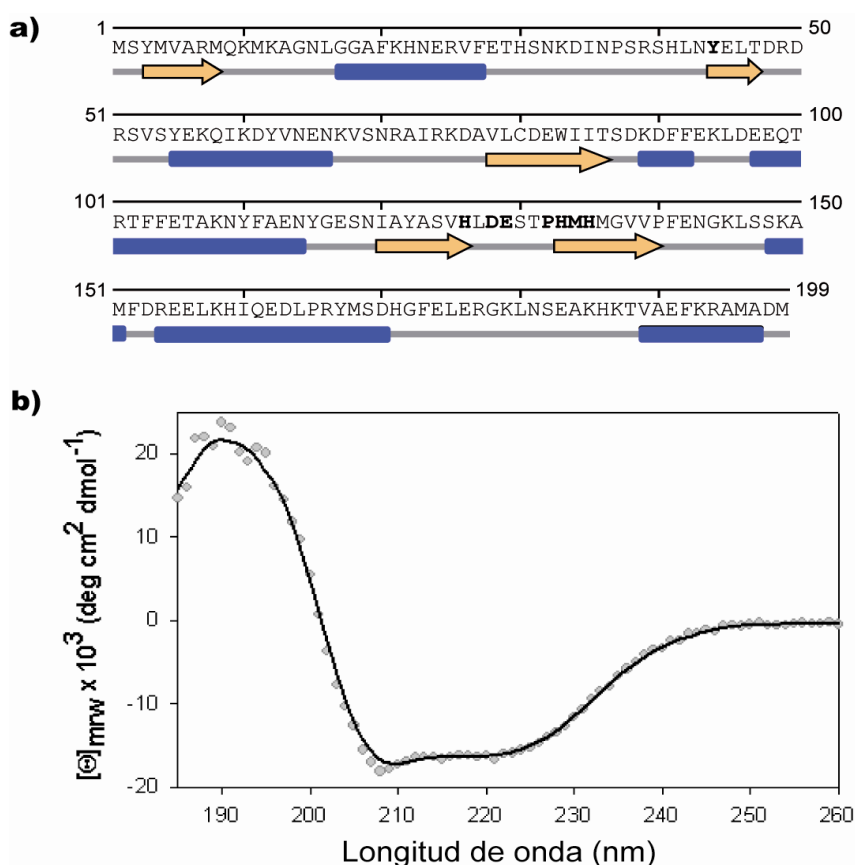


Figura 34. Análisis de la estructura secundaria de MobMN199.

A) Predicción de la distribución de estructuras secundarias sobre la secuencia de la proteína mediante los programas PSIPred, Jpred, NPS@, SABLE y PredictProtein. Las flechas y los cilindros indican cadena- β o hélice- α , respectivamente. Los aminoácidos destacados en negrita indican la posición de la Tyr catalítica propuesta (Grohmann *et al.*, 1999) y la triada de histidinas que coordinarían el metal divalente. **B)** Espectro CD de MobMN199 en el UV lejano, adquirido en una cubeta de cuarzo (0.2 mm de paso óptico) a 10°C en tampón CD1. Cada espectro es el resultado de 4 acumulaciones con una velocidad de barrido de 20 nm min⁻¹ y un ancho de banda de 1 nm. La señal de fondo se corrigió mediante sustracción del espectro del tampón. La línea continua representa el ajuste de los valores experimentales (esferas grises) mediante el programa CONTIN-L. El espectro presenta dos mínimos de elipticidad a 208 y 222 nm, característico de proteínas con alto contenido en hélice- α .

El espectro CD de MobMN199 (15 μ M) obtenido en el UV-lejano (185-260 nm) mostró dos picos mínimos en la señal de elipticidad a 208 y 222 nm y un máximo a 193 nm, característico de las proteínas con alto contenido en hélices- α (Fig. 34B). Mediante la deconvolución de los datos registrados con dos programas diferentes (CONTIN y SELCON3) se pudo determinar la composición en estructura secundaria, estableciendo un consenso que se ajusta muy bien a la estimación inicial desde el análisis bioinformático de la secuencia de MobMN199 (Tabla 9).

Tabla 9. **Contenido en estructura secundaria de la proteína MobMN199.**

		Hélice- α	Cadena- β	Giros	No-asignado
<i>Método de</i>	CONTIN	41.1	14.8	20.2	24
<i>Deconvolución</i>	SELCON3	47.4	7.9	22	24.1
	Media	44.2 \pm 4.5	11.4 \pm 4.9	21.1 \pm 1.3	24 \pm 0.1
<i>Programa de</i>	PSIPred	41.9	19.2	N.D.	38.9
<i>Predicción</i>	Jpred	38.4	16.2	N.D.	45.5
	NPS@	47.5	10.1	N.D.	42.4
	SABLE	37.9	18.2	N.D.	43.9
	PredictProtein	36.9	15.7	N.D.	47.5
	Media	40.5 \pm 4.3	15.9 \pm 3.5	-	43.6 \pm 3.2

¹Los datos y las desviaciones estándar se presentan en porcentaje. N.D. no determinado.

2.5. Medidas de estabilidad térmica de MobMN199

Mediante CD, también se analizaron los perfiles de desnaturalización térmica de la proteína MobMN199 (15 μ M), en presencia o ausencia de cationes divalentes Mn^{2+} o Mg^{2+} . Dado que estos cationes precipitan en el tampón CD1 (tampón fosfato), fue necesario dializar la muestra en otro tampón compatible basado en Hepes (tampón CD2). En este tampón la señal de dicroísmo presenta más interferencia a ciertas longitudes de onda (<210 nm) en el UV-lejano. Por esta razón, para detectar los cambios en la elipticidad en función al aumento de temperatura (10-90°C) se realizaron las lecturas a una longitud de onda de 218 nm, a una tasa de incremento de 50°C por hora (Fig. 35A). Además, durante el experimento se tomaron lecturas en el espectro desde 205 hasta 260 nm a temperaturas de 10, 30, 40 y 85°C (Fig. 35B-D). Tras alcanzar los 90°C, se enfriaron las muestras nuevamente a 10°C, y se tomó otro espectro en el mismo rango de longitud de onda. Los resultados mostraron una pérdida progresiva en la señal de elipticidad desde el principio del análisis (Fig. 35A, curva roja) y la temperatura de fusión (T_m) estimada fue de 33°C. Se observó un

comportamiento similar cuando se repitieron los ensayos con una muestra a la que se añadió previamente MgCl_2 (15 mM), comenzando a desnaturalizarse a los 20°C y con una T_m de 33°C (Fig. 35A, curva negra). No obstante, el análisis de desnaturalización térmica en presencia de 15 mM de MnCl_2 resultó en un retardo significativo en la pérdida de señal, comenzando a los 35°C, y aumentando la T_m hasta 51°C (Fig. 35A, curva verde). Estos datos indicaron que los iones Mn^{2+} , pero no Mg^{2+} , aportan estabilidad térmica a la proteína MobMN199.

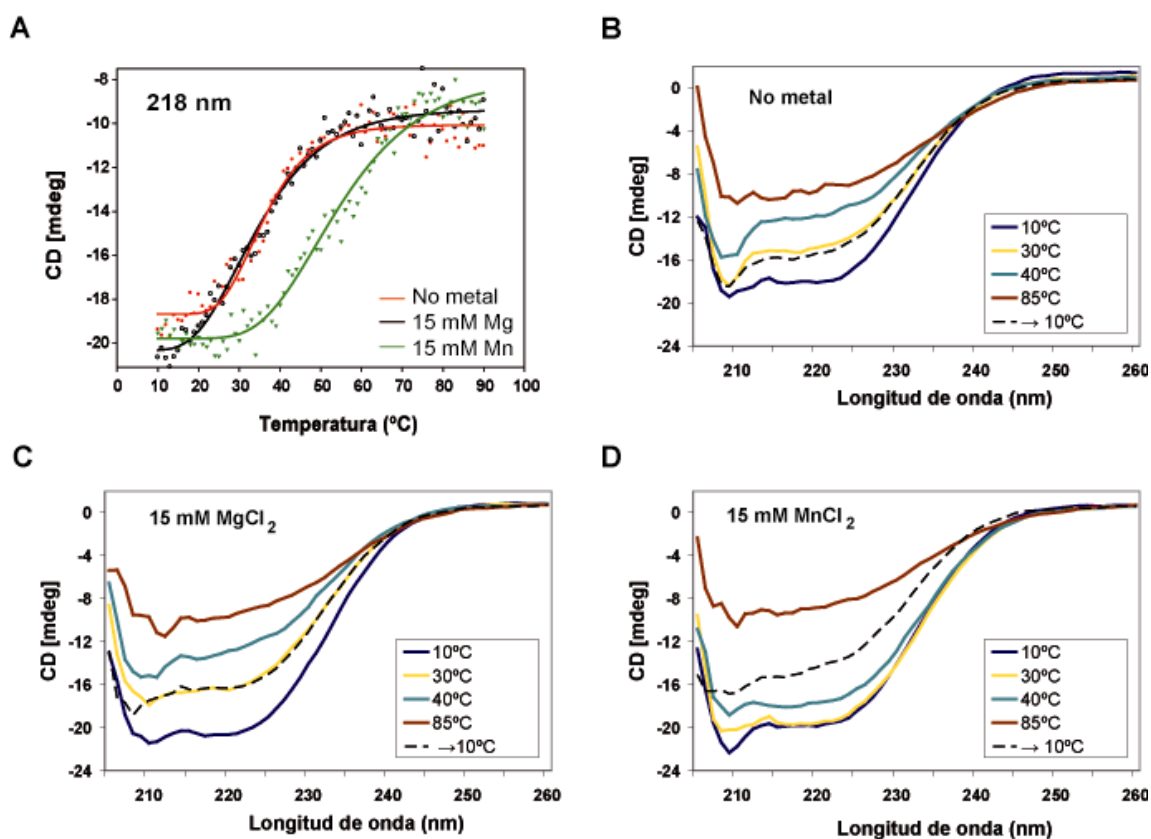


Figura 35. Análisis de la estabilidad térmica de MobMN199 (15 μM).

A) Perfiles de desnaturalización térmica de MobMN199 en función a los cambios en elipticidad a 218 nm, en ausencia o presencia de Mn^{2+} o Mg^{2+} (15 mM). Los datos experimentales (puntos) se ajustaron a un modelo de dos estados, desde el monómero de proteína plegado hasta el monómero totalmente desnaturalizado. **B-D)** Espectros de dicroísmo circular de MobMN199 en el UV lejano sin metal divalente (**B**) o con una concentración de 15mM de Mg^{2+} (**C**) o Mn^{2+} (**D**), a diferentes temperaturas en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico. Las curvas discontinuas corresponden a las lecturas tomadas tras enfriar las muestras nuevamente a la temperatura inicial del experimento ($\rightarrow 10^\circ\text{C}$).

2.6. Actividad de MobMN199 de tras la desnaturalización térmica

Tras comparar los espectros obtenidos durante la desnaturalización con los espectros registrados después de enfriar las muestras a 10°C, se observó una recuperación en la señal de dicroísmo, independientemente de la presencia de

cationes. No obstante, la recuperación de la señal no es absoluta y equivale al espectro recogido a 30°C durante la desnaturalización de la muestra sin catión (Fig. 35B-D, curvas discontinuas). Esto podría indicar que, en la proteína MobMN199, los cambios estructurales inducidos por temperatura podrían ser parcialmente reversibles, probablemente a causa de la existencia de varios dominios de plegamiento con diferentes capacidades de renaturalización. Para estudiar si estos cambios afectaban a la actividad catalítica, se incubaron las diferentes muestras de proteína MobMN199 (a una concentración de 240 nM) con DNA superenrollado de pMV158 (8 nM), a 30°C y en presencia o ausencia de cationes divalentes. Tras separar las muestras en geles de agarosa (1.5%) con 0.5 µg/ml de BrEt, se observaron diferentes formas plasmídicas: formas FII y formas FI' (moléculas relajadas y cerradas covalentemente), como resultado de la actividad de corte y cierre de MobMN199, respectivamente (Fig. 36). Concretamente, con la proteína control (sin desnaturalizar en el dicrógrafo) se obtuvieron un 60% de formas FII, de las cuales un 50% fueron convertidas en formas FI', tanto con Mg²⁺ como con Mn²⁺. La muestra de proteína renaturalizada sin cationes retuvo la actividad de corte (50% FII), pero la capacidad para cerrar esas moléculas fue significativamente menor (sólo un 15% FI'). Sin embargo, cuando se emplearon las muestras de proteína que habían sido tratadas y renaturalizadas en presencia de cationes, la actividad de cierre se recuperó de forma parcial o total con Mg²⁺ (33% FI') o Mn²⁺ (52% FI'), respectivamente.

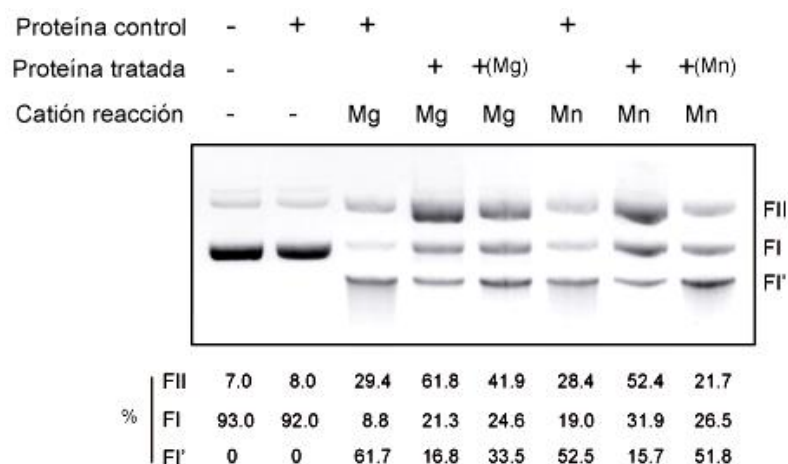


Figura 36. Actividad de corte/cierre de MobMN199 tras el tratamiento de desnaturalización térmica, con o sin metales divalentes.

En cada reacción se empleó una concentración de DNA de 8 nM y se incubó sin o con proteína (240 nM) en presencia de catión (15 mM) a 30°C, 30 min. Los controles se realizaron con una muestra del mismo stock de proteína, que no fue desnaturalizada en el dicrógrafo (Proteína control). FI, DNA plasmídico superenrollado; FII, DNA relajado por la actividad de corte de MobMN199; FI', DNA relajado y cerrado covalentemente por la actividad de corte y cierre de MobMN199.

2.7. Efecto de los iones Mn^{2+} en la desnaturalización de MobMN199

Para estudiar más detalladamente el efecto del Mn^{2+} sobre MobMN199, se realizaron nuevos ensayos de desnaturalización térmica en presencia de diferentes concentraciones de catión Mn^{2+} . Los cambios en la estructura secundaria inducidos por el aumento de temperatura se midieron en función a la pérdida de señal de elipticidad a 218 nm (Fig. 37A). Tras normalizar y representar los datos experimentales obtenidos con el programa SigmaPlot, se realizó un ajuste a un modelo de dos estados de transición (desde el monómero de proteína plegado al monómero desnaturalizado), a partir del cual se pudo estimar la temperatura de desnaturalización (T_m). Los resultados mostraron una clara dependencia de la estabilidad térmica de MobMN199 en función a la concentración de catión, con un aumento en la T_m de más de 14°C en un rango que varió desde 20 μM hasta 15 mM de $MnCl_2$ (Fig. 37B). La concentración de proteína en todos los ensayos de desnaturalización fue de 15 μM . Asumiendo que la estequiometría de unión del metal en el motivo de coordinación de histidinas es 1:1 (ver Fig. 57, capítulo 3), podría decirse que la reacción se encontraba en condiciones de saturación desde la dosis más baja de Mn^{2+} empleada (20 μM). Sin embargo, la resistencia a la desnaturalización térmica de MobMN199 aumentó considerablemente en función a la concentración de $MnCl_2$. Este fenómeno se explica teniendo en cuenta que la unión del metal a la forma nativa de la proteína aumenta la T_m y este incremento (ΔT_m) se hace mayor en función a la concentración libre de Mn^{2+} en una forma no saturante (Fig. 37B). Además, este efecto depende de la afinidad de la proteína por el ligando, según se expresa en la siguiente ecuación (Brandts & Lin, 1990; Sánchez-Ruiz, 1992):

$$K_{app} = K_D / (1 + K_B [L])$$

donde, K_{app} es la constante de desnaturalización aparente a una concentración determinada de ligando, K_D es la constante de desnaturalización intrínseca de la proteína (sin ligando), K_B es la constante de afinidad de la proteína por el ligando, y $[L]$ es la concentración de ligando libre.

Debido a la influencia del Mn^{2+} en la estabilidad térmica de MobMN199 se quiso estimar la afinidad y estequiometría de unión entre este metal y la proteína, mediante análisis por ITC. Las medidas del calor liberado o absorbido al inyectar $MnCl_2$ (1mM) sobre una solución de proteína (89 μM) en tampón ITC, se realizaron en un calorímetro VP-ITC (MicroCal) manteniendo una temperatura constante de 17 °C y

con una agitación continua de 350 rpm. Para cuantificar la unión se calcularon las constantes de disociación ajustando los datos mediante una regresión no lineal a un modelo de unión a sitios independientes con el programa Origin (MicroCal). Se permitió que los valores de la constante de asociación (K_b), la estequiometría metal-proteína (n) y el cambio de entalpía (ΔH) variasen en el proceso de ajuste. El ajuste obtenido reveló un valor de n próximo a 1, lo cual indicó que cada molécula de MobMN199 reconoce un solo ión Mn^{2+} . Además, la media de la constante de disociación obtenida en tres ensayos fue de 260 (± 4) nM, indicando que MobMN199 tiene alta afinidad por este metal.

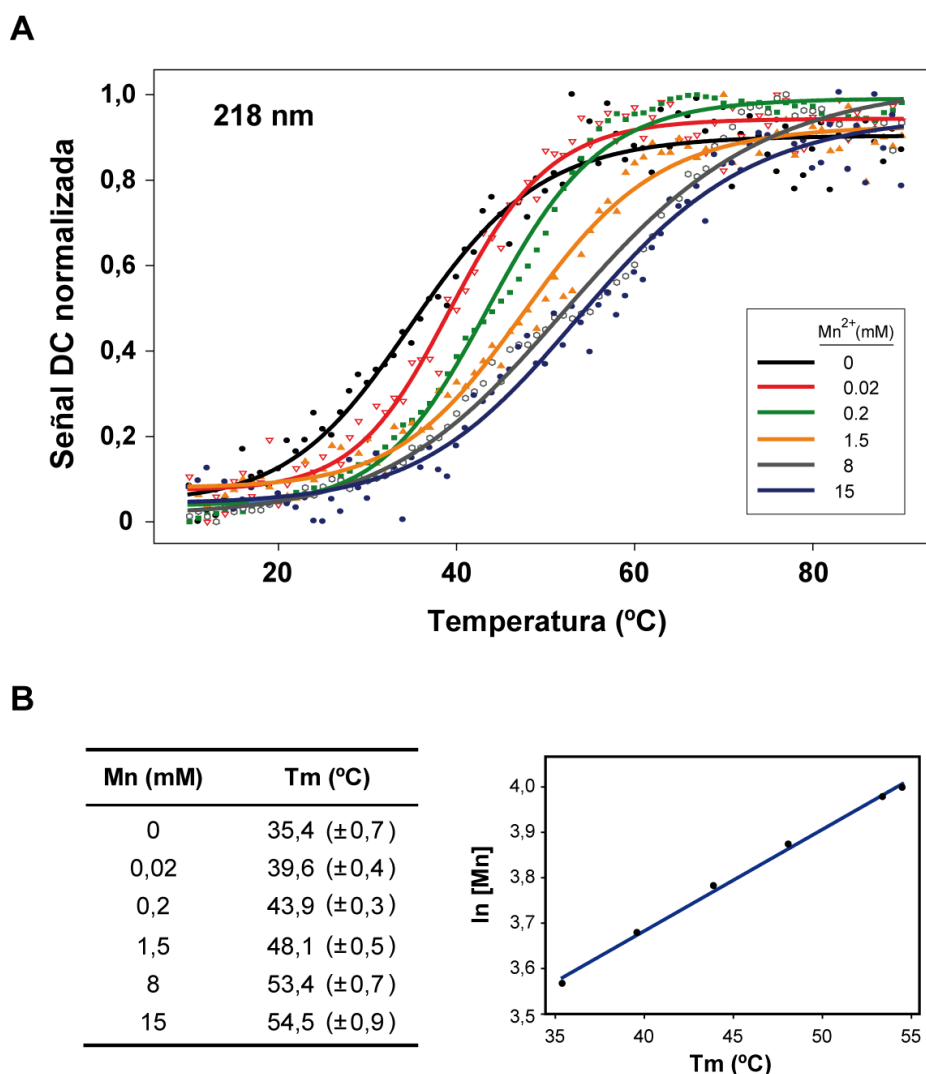


Figura 37. Estabilidad térmica de MobMN199 con diferentes concentraciones de $MnCl_2$.

A) Perfiles de desnaturalización. Los cambios en la señal de elipticidad de dicroísmo circular (CD) se registraron a 218 nm. Los datos experimentales (puntos) se ajustaron a un modelo de dos estados (curvas), desde el monómero de proteína plegado hasta el monómero totalmente desnaturalizado. **B)** Temperaturas de desnaturalización (T_m) estimadas en cada análisis, con las desviaciones estándar entre paréntesis (izquierda) y representación gráfica del $\ln [Mn]$ frente a T_m (derecha).

**CAPÍTULO 3: INTERACCIONES ENTRE MobM Y EL ORIGEN DE
TRANSFERENCIA DE pMV158**

Las interacciones entre la proteína MobM y su DNA diana han sido objeto de estudio en nuestro laboratorio. En la actualidad, se sabe que el sitio de corte mediado por MobM, dentro del origen de transferencia (*oriT*) de pMV158, se localiza entre las coordenadas 3595 y 3596 de la secuencia plasmídica, y que, tras el corte, la proteína queda unida al extremo 5' del DNA de forma estable, dejando libre el extremo 3' (Guzmán & Espinosa, 1997). Además, se demostró que aunque MobM podía reconocer fragmentos de DNA bicatenario lineal con la secuencia del *oriT*, el sustrato debía estar en forma monocatenaria para que esta proteína pudiera introducir el corte específico, si bien la reacción fue muy poco eficiente (Grohmann *et al.*, 1999). Para intentar avanzar en el conocimiento de las interacciones MobM-*oriT*, se diseñaron una serie de experimentos en los que se empleó como sustrato, bien DNA superenrollado del plásmido pMV158 o bien fragmentos de DNA lineal, mono- y bi-catenario, que incluían la región del *oriT*. Gran parte de los resultados que se muestran a continuación fueron obtenidos mediante colaboración con cuatro grupos distintos: El grupo del Dr. Rudi Lurz, del Instituto de Genética Molecular Max-Planck (Berlín, Alemania), para la realización de estudios de interacciones DNA-proteína por microscopía electrónica; el grupo del Dr. Joel F. Schildbach, en el Departamento de Biología de la Universidad de Johns Hopkins (Baltimore, USA), en el que se realizaron los ensayos de interacción de MobM y MobMN199 con oligonucleótidos fluorescentes; el grupo de la Dra. Margarita Menéndez, del Instituto de Química-Física "Rocasolano" (CSIC, Madrid), el análisis de interacciones DNA-proteína mediante barrido de calorimetría diferencial; y el grupo del Dr. Miquel Coll, en el Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), donde la Dra. Silvia Russi ha resuelto la estructura tridimensional del domino relaxasa de MobM unido a DNA.

3.1. El origen de transferencia de pMV158 tiene tres IRs

Mediante análisis de secuencia y búsqueda de homologías en la base de datos se observó un elevado grado de conservación de secuencia entre los orígenes de transferencia (*oriT*) de los plásmidos de la familia de pMV158 (Fig. 38), dentro de una región de 41 pb con un contenido en AT del 75.6% (31/41). En un estudio previo se definieron dos repeticiones invertidas (IR1 e IR2) dentro de la secuencia del *oriT* de pMV158, supuestamente capaces de formar estructuras secundarias de tipo tallo-lazo (Guzmán & Espinosa, 1997). Sin embargo, en el presente trabajo hemos identificado una tercera repetición (IR3) tras extender la región de análisis hacia el extremo 5' del *oriT*. La Figura 39 ilustra las posibles conformaciones de de estas tres repeticiones invertidas. En detalle, el IR1 ($\Delta G = -4.03$ kcal/mol) es una secuencia de 18 nucleótidos

(coordenadas 3569-3587 en pMV158), con un tallo de 7 pb y un lazo de 4 nucleótidos desapareados (5'-GAAT-3'). El IR2 ($\Delta G = -4.4$ kcal/mol) comprende una secuencia inversa repetida de 24 nucleótidos (coordenadas 3582-3605), capaz de formar una estructura cruciforme con un tallo de 9 pb y un lazo desapareado de 6 nucleótidos, dentro del cual se encuentra el sitio de corte (5'-GTGTG/T-3'). Finalmente, el IR3 ($\Delta G = -6.88$ kcal/mol) consiste en una secuencia inversa repetida imperfecta de 31 nucleótidos (coordenadas 3565-3595), que incluye la secuencia de IR1 y se prolonga 5 pb más hacia la base del tallo, dejando 3 nucleótidos desapareados (5'-ATA-3') en el brazo derecho (IR3-L). El extremo 3' del IR-3 coincide con el nucleótido G, correspondiente al dinucleótido 5'-G/T-3' del sitio de corte.

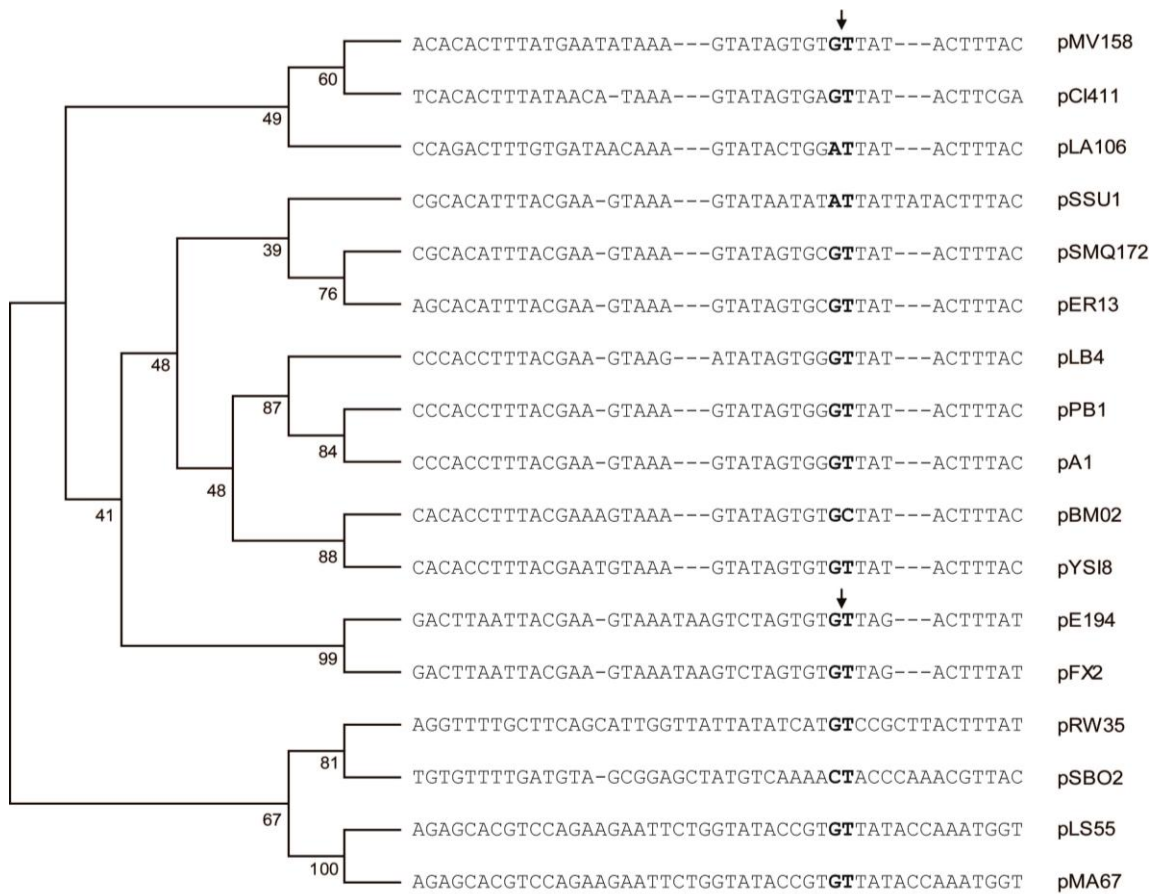


Figura 38. Árbol filogenético y alineamiento de la secuencia del *oriT* de la familia de plásmidos de replicación por círculo rodante (RC) de pMV158.

En cada rama del árbol se muestra el valor de *bootstrap* obtenido (%) tras 1000 replicas. El dinucleótido propuesto en cada plásmido como sitio de corte se indica en negrita, además de con una flecha en los dos casos en que se han mapeado experimentalmente (pMV158 y pE194; Grohmann *et al.*, 1997).

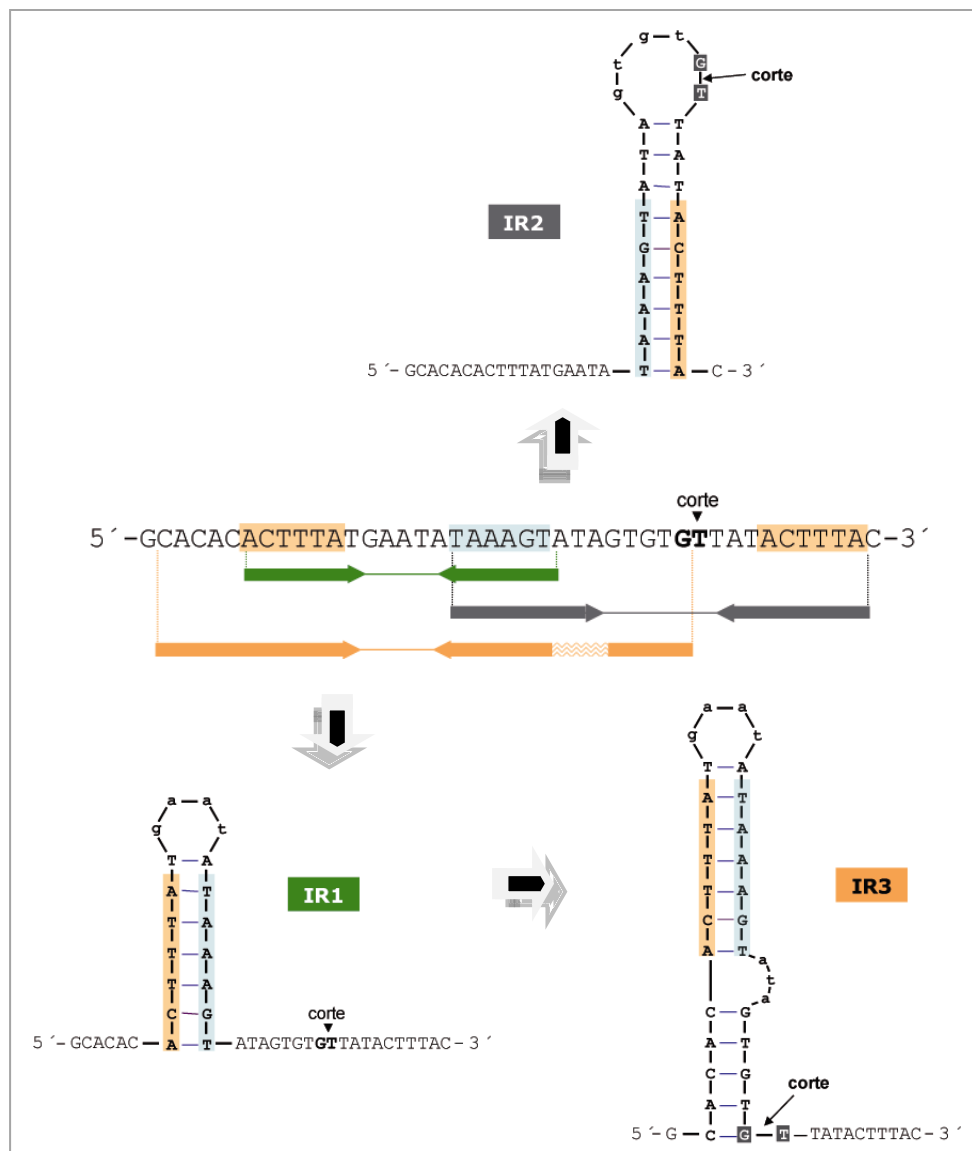


Figura 39. Representación de las posibles estructuras secundarias que se pueden formar en la cadena transferente del *oriT* de pMV158.

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).

Un análisis detallado de cada uno de los brazos de los IR, reveló que en el brazo izquierdo de IR1 y de IR3 (IR1/3-L) y en el brazo derecho de IR2 (IR2-R) existe una región de 6 pb cuya secuencia nucleotídica es idéntica (5'-ACTTTA-3'). Además, dado que hay un solapamiento parcial entre el brazo derecho de IR1/3 (IR1/3-R) y el brazo izquierdo de IR2 (IR2-L), la secuencia complementaria es físicamente la misma (5'-TAAAGT-3'), de manera que la extrusión de IR2 para formar una estructura tipo tallo-lazo, impediría la formación de IR1/3 y viceversa. El hecho de que esta secuencia esté tan conservada hizo pensar que dichas IR debían estar implicadas en el

reconocimiento de la proteína MobM para i) la formación del relaxosoma durante el inicio de la transferencia en la célula donadora, y/o ii) la reacción de terminación por cierre de la cadena transferente una vez haya entrado en la célula receptora.

3.2. Reconocimiento de diferentes sustratos de DNA por MobM

Como primera aproximación en el estudio de las interacciones de la proteína MobM y su DNA diana, se intentaron separar complejos específicos mediante ensayos de retardo de movilidad en gel (EMSA) empleando un fragmento de DNA lineal (364 pb) amplificado por PCR que contenía la secuencia entera del *oriT*. Tras múltiples intentos de optimización de las condiciones de reacción (fuerza iónica, temperatura, y/o dosis de proteína variables) o de separación electroforética (porcentajes de poliacrilamida del gel, temperatura o carga en carrera), se consiguieron separar complejos específicos DNA-proteína. Sin embargo, la proporción de estos complejos respecto al DNA libre fue minoritaria, lo cual refleja una interacción muy débil entre MobM y este sustrato (Fig. 40A). Además, en todos los ensayos se observó cierta tendencia de agregación con el DNA a concentraciones altas de proteína, formando complejos supra-macromoleculares (véanse los complejos retenidos en el último pocillo de la Figura 40A). Por esto, en los siguientes experimentos se planteó la realización de ensayos EMSA con DNA superenrollado de pMV158, en lugar de con DNA lineal. Básicamente, se incubó el DNA (8 nM) con $MnCl_2$ (15 mM) durante 30 min a 30°C, añadiendo la misma concentración de MobM (240 nM) que había mostrado una respuesta lineal en los ensayos de corte realizados previamente (ver Fig. 32A, capítulo 2). A continuación, las muestras se trataron o no con proteinasa K y se analizaron en un gel de agarosa al 1% (Fig. 40B). Teniendo en cuenta que tras el corte la proteína queda unida de manera estable al DNA (Guzmán & Espinosa, 1997), solamente se pudieron resolver las formas plasmídicas relajadas cuando se añadió proteinasa K antes de analizar la muestra en el gel. Cuando no se añadió proteinasa K, el macrocomplejo MobM-pMV158 quedó retenido en el pocillo (calle 3 en la Fig. 40B). Posteriormente, se repitió el experimento con DNA superenrollado y, sin realizar un tratamiento previo con proteinasa K, se procedió a la digestión mediante enzimas de restricción (*EcoRI* + *AflI*) y se resolvieron las muestras en geles de acrilamida. El perfil teórico de restricción con estas dos enzimas se compone de 4 fragmentos de diferentes tamaños (3556, 852, 587 y 545 pb). Los resultados mostraron diferencias de movilidad del fragmento de restricción que contenía el *oriT* (correspondiente al de 545 pb) el cual quedó retenido en el pocillo del gel, respecto a un control negativo en el que no se añadió proteína MobM (Fig. 40C).

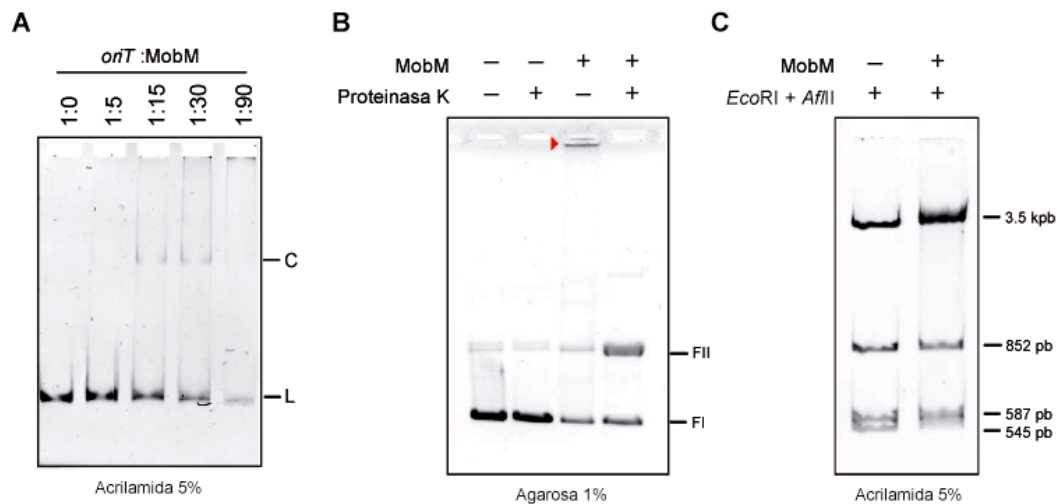


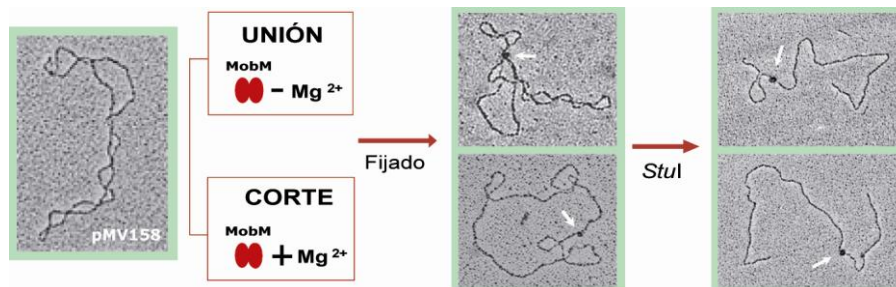
Figura 40. EMSA con DNA bicatenario lineal (A) o superenrollado (B y C).

A) Tras incubar diferentes dosis de proteína MobM con un fragmento de DNA lineal (20 nM) que contenía la secuencia del *oriT*, se separaron los complejos proteína:DNA (C) del DNA libre (L) mediante electroforesis en gel de PAA al 5%. **B)** Las reacciones de corte de DNA superenrollado de pMV158 (8 nM) con MobM (240 nM) se incubaron en ausencia o presencia de proteínas K (0.2 mg/ml) durante 10 min a 37°C. El análisis de las muestras en un gel de agarosa (1%) permitió separar las formas superenrolladas (FI) de las relajadas por la actividad de MobM (FII), quedando retenidas en el pocillo (punta de flecha roja) cuando no se trató la muestra con proteínas K. **C)** Las reacciones de corte con DNA superenrollado que no fueron tratadas con proteínas K (carriles 1 y 3 en B), se resolvieron en gels de PAA (5%) tras digerir el DNA con dos enzimas de restricción (*EcoRI* y *AflII*). El fragmento de restricción más pequeño (545 pb) contiene la región del *oriT*, y desaparece en presencia de MobM, quedando retenido en el pocillo.

Una aproximación similar se llevó a cabo para visualizar los complejos MobM-pMV158 a través de microscopía electrónica. En este caso, tras la incubación de la proteína MobM con el DNA plasmídico, en presencia (unión y corte) o ausencia (sólo unión) de $MgCl_2$, los complejos proteína-DNA se fijaron con glutaraldehído y se prepararon para ser examinados en el microscopio. De esta forma, se visualizaron complejos formados por MobM unida a DNA superenrollado (condiciones de unión) o a DNA relajado (condiciones de corte). Además, los mismos ensayos se repitieron incluyendo una digestión del DNA con una enzima de restricción de sitio único (*StuI*) después del fijado con glutaraldehído (Fig. 41A). Tomando como referencia el sitio *StuI* (coordenada 4626), se pudieron determinar las regiones primarias de interacción de MobM con pMV158 (Fig. 41B). En condiciones de unión la coordenada de unión de MobM corresponde con la posición 3585. Mientras, en condiciones de corte fue 3596. Estos resultados se ajustan perfectamente con la posición del sitio de corte en el *oriT* de pMV158, mapeado previamente entre las coordenadas 3595 y 3596 (Guzmán & Espinosa, 1997). Cuando los análisis se realizaron con MobM y un fragmento de DNA lineal que incluye la secuencia del *oriT* no se observaron complejos al microscopio (no

se muestra), lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos mediante EMSA (Fig. 40A) y confirma que esta proteína se une con poca afinidad a este tipo de DNA.

A



B

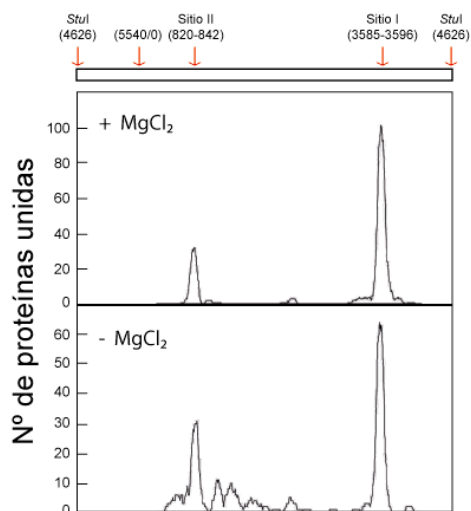


Figura 41. Mapeo de los sitios de unión de la proteína MobM en el plásmido pMV158 mediante microscopía electrónica.

A) Visualización de los complejos formados por MobM y pMV158 en condiciones de unión (DNA superenrollado) y de corte (DNA relajado) tras un tratamiento de fijado con glutaraldehído. **B)** Distribución de la unión de MobM sobre pMV158. Los complejos se incubaron con una enzima de restricción de sitio único en pMV158 (*Stul*) y se estimaron las coordenadas de unión de la proteína en las diferentes condiciones del ensayo.

MobM debería reconocer un sustrato monocatenario en la reacción de cierre sobre el DNA plasmídico que se transfiere a la célula receptora en forma de cadena sencilla. Por ello se quisieron estudiar las interacciones con oligonucleótidos que incluían la secuencia del *oriT*. Concretamente, se sintetizaron tres oligonucleótidos que contenían la secuencia IR2, IR3 (que a su vez incluye a IR1) o ambas repeticiones invertidas (ORIT). Estos oligonucleótidos estaban marcados en uno de los extremos con Cy5, una molécula fluorescente cuyo máximo de absorción y de emisión es 448 nm y 468 nm de longitud de onda, respectivamente (Tabla 5). Las principales ventajas

de esta técnica son la seguridad y la rapidez, ya que es tan sensible como el uso de DNA marcado radiactivamente con ^{32}P y no requiere la manipulación y revelado de los geles, visualizando el DNA fluorescente directamente en un escáner Typhoon (Molecular Dynamics) o Phosphorimager (Fuji). Las únicas precauciones consistieron en evitar la incidencia de luz natural directamente sobre las muestras (electroforesis en oscuridad) y el uso de un tampón de carga sin colorantes (BFB o XC), ya que interfieren en las lecturas de fluorescencia. Los análisis de movilidad diferencial en geles nativos de acrilamida al 5% se realizaron tanto con la proteína MobM como con su versión truncada MobMN199 (Fig. 29, capítulo 2). Los resultados demostraron que el reconocimiento de ambas proteínas por secuencias de DNA monocatenario que contienen todo o parte del *oriT* es específico. Mientras que la capacidad de unión fue similar cuando se usaron los oligonucleótidos IR3 y ORIT, no se observó formación de complejos DNA-proteína en los ensayos con el oligonucleótido IR2, quedando todo o la gran mayoría del DNA en estado libre, incluso a altas concentraciones de MobM o MobMN199 (Fig. 42). Por alguna razón que aún desconocemos, la proteína MobM tiene tendencia a agregar en presencia de los oligonucleótidos IR3 y ORIT, de forma que los complejos quedan retenidos en el pocillo del gel. No obstante, este fenómeno no se observa con el oligonucleótido IR2 (Fig. 42). Dado que la proteína MobM no tiene afinidad por DNA bicatenario lineal, pero reconoce específicamente una secuencia monocatenaria dentro del *oriT* de pMV158, se podría sugerir que la conformación de esta región diana tiene una topología diferente a la doble cadena. Esta hipótesis se analiza en los siguientes apartados de este capítulo.

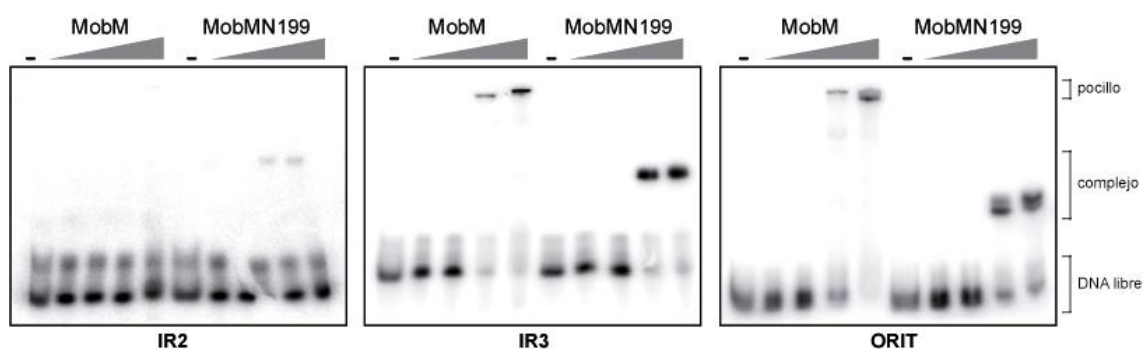


Figura 42. Capacidad de unión MobM o MobMN199 a IR2, IR3 y ORIT.

Se prepararon mezclas que contenían una concentración fija de DNA marcado (2nM) y diferentes cantidades proteína MobMN199. Tras incubar 20 min a 24°C, las muestras se analizaron en geles nativos de PAA (10%).

3.3. Interacciones entre MobM y DNA superenrollado de pMV158

Para llevar a cabo este estudio se realizaron diferentes análisis de *footprinting* con DNA superenrollado de pMV158 según se esquematiza en la Figura 43. Básicamente, con esta técnica se analizan las regiones protegidas del DNA (huella o *footprint*) por la unión de una proteína, frente a la acción de diferentes agentes modificadores. Para ello, se incubaron 2 µg de DNA plasmídico (11 nM) con varias concentraciones de proteína MobM (0.25, 0.5, 1 o 2 µM), durante 25 min a 24 °C, en reacciones de 50 µl. Estas concentraciones fueron similares a las empleadas en los ensayos de relajación (0.12, 0.24 o 0.58 µM) realizados previamente (ver Fig. 32A, capítulo 2), aunque en este caso no se añadió catión (Mn^{2+} o Mg^{2+}) para favorecer solamente la unión de la proteína. Después del periodo de incubación, las muestras se trataron con diferentes agentes modificadores químicos, tales como dimetilsulfato (DMS) y permanganato potásico ($KMnO_4$), o enzimáticos, como DNasa I.

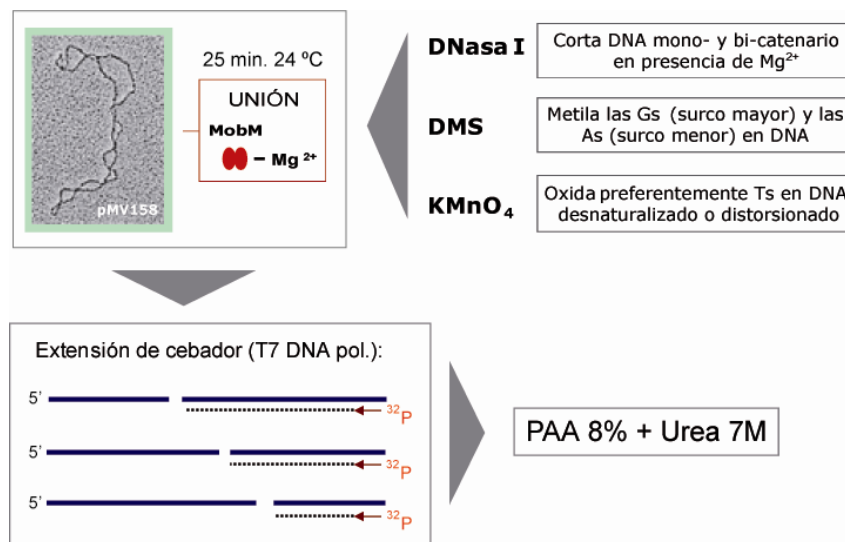


Figura 43. Aproximación experimental para el análisis de las interacciones entre MobM y el *oriT* mediante *footprinting* sobre DNA superenrollado.

En los ensayos se incubaron 2 µg de DNA de pMV158 con diferentes dosis de proteína MobM (0.25, 0.5, 1 y 2 µM), durante 25 min a 24 °C. A continuación, las muestras se trataron, individualmente, con distintos agentes modificadores: 30 mM de dimetilsulfato (DMS), 5mM de permanganato potásico ($KMnO_4$) o 0.5 U de DNasa I. Las reacciones de modificación se pararon con el tampón STOP correspondiente (Tabla 5), y tras precipitar el DNA se procedió al anillamiento y extensión de un oligonucleótido (F1 o PR2) marcado radiactivamente (³²P), con una mezcla de T7 DNA polimerasa y dNTPs. Los nucleótidos metilados por DMS, oxidados por $KMnO_4$ o digeridos con DNasa I se identificaron tras resolver las muestras de DNA en gels desnaturalizantes (8 % PAA y 7 M de urea), en los que también se cargaron reacciones de secuencia (Sanger) empleando el mismo oligonucleótido.

A continuación, tras limpiar, precipitar y desnaturalizar el DNA, se anilló el oligonucleótido F1 o PR2 (Tabla 5) marcado radiactivamente y se extendió con T7

DNA polimerasa. Para mapear los cambios introducidos en la cadena azúcar-fosfato del DNA con cada uno de los agentes (en presencia o ausencia de MobM), se resolvieron los productos de la extensión en geles desnaturalizantes (PAA 8%, 7M urea), junto con reacciones de secuencia obtenidas con el mismo oligonucleótido. Hay que destacar que la extensión del cebador por la T7 DNA polimerasa se detiene justo en la base anterior a la que ha sido modificada (aunque incorpore un nucleótido más, lo elimina por actividad *proofreading*). En la secuenciación de DNA (Sanger *et al.*, 1977), la extensión se detiene cuando se incorpora un ddNTP (que a su vez tiene un átomo de oxígeno menos que un dNTP). Por esto, para realizar un análisis preciso de los geles, es necesario corregir las diferencias que hay entre el tamaño y peso molecular de las secuencias de referencia respecto a los DNAs extendidos, teniendo en cuenta que estos últimos tienen un nucleótido menos y migran más rápido. Para determinar la región del *oriT* reconocida por MobM sobre DNA superenrollado, se realizó un análisis de *footprinting* con DNasa I. Las principales ventajas en el uso de esta enzima son: i) la actividad endonucleasa, ya que digiere el enlace fosfodiéster en DNA mono- y bi-catenario de forma inespecífica en presencia de iones Mg^{2+} , ii) su tamaño medio (masa molecular ≈ 39 kDa), de manera que las regiones de DNA reconocidas específicamente por una proteína, son inaccesibles para la DNasa I y quedan protegidas de su actividad, y iii) la sensibilidad a agentes como el EDTA, ya que secuestran el catión Mg^{2+} y se puede detener la actividad de forma controlada. La desventaja a la hora de mapear regiones protegidas de DNA por una proteína como MobM, es precisamente que esta también tiene actividad endonucleolítica en presencia de cationes divalentes (Fig. 32A, capítulo 2). Por ello, a pesar de que no se añadió catión durante la incubación de MobM con pMV158, el tratamiento posterior con una mezcla de DNasa I (0.5 unidades) y $MgCl_2$ (6 mM) durante 2 min, fue suficiente para que parte de las moléculas de DNA superenrollado sufrieran corte por MobM. Este fenómeno pudo observarse claramente en una reacción control, en la que se añadió MobM y $MgCl_2$, pero no se trató con DNasa I, de manera que la extensión del cebador F1 paró mayoritariamente en el sitio de corte mediado por MobM (Fig. 44A). No obstante, los resultados obtenidos tras comparar los perfiles de digestión del DNA incubado o no con MobM (Fig. 44), mostraron una protección muy clara de las secuencias del *oriT* que comprenden el brazo izquierdo de IR1 (IR1-L) y el brazo derecho del IR3 (IR3-R). Además, también se observó un aumento en la digestión por DNasa I en la región que separa ambos brazos a medida que aumentaba la dosis de proteína MobM. Estos datos indicaban que la conformación del *oriT* podía adoptar una estructura secundaria de tipo IR1 (Fig. 39), en la que el tallo está protegido y el lazo hiperexpuesto en presencia de MobM (Fig. 44C).

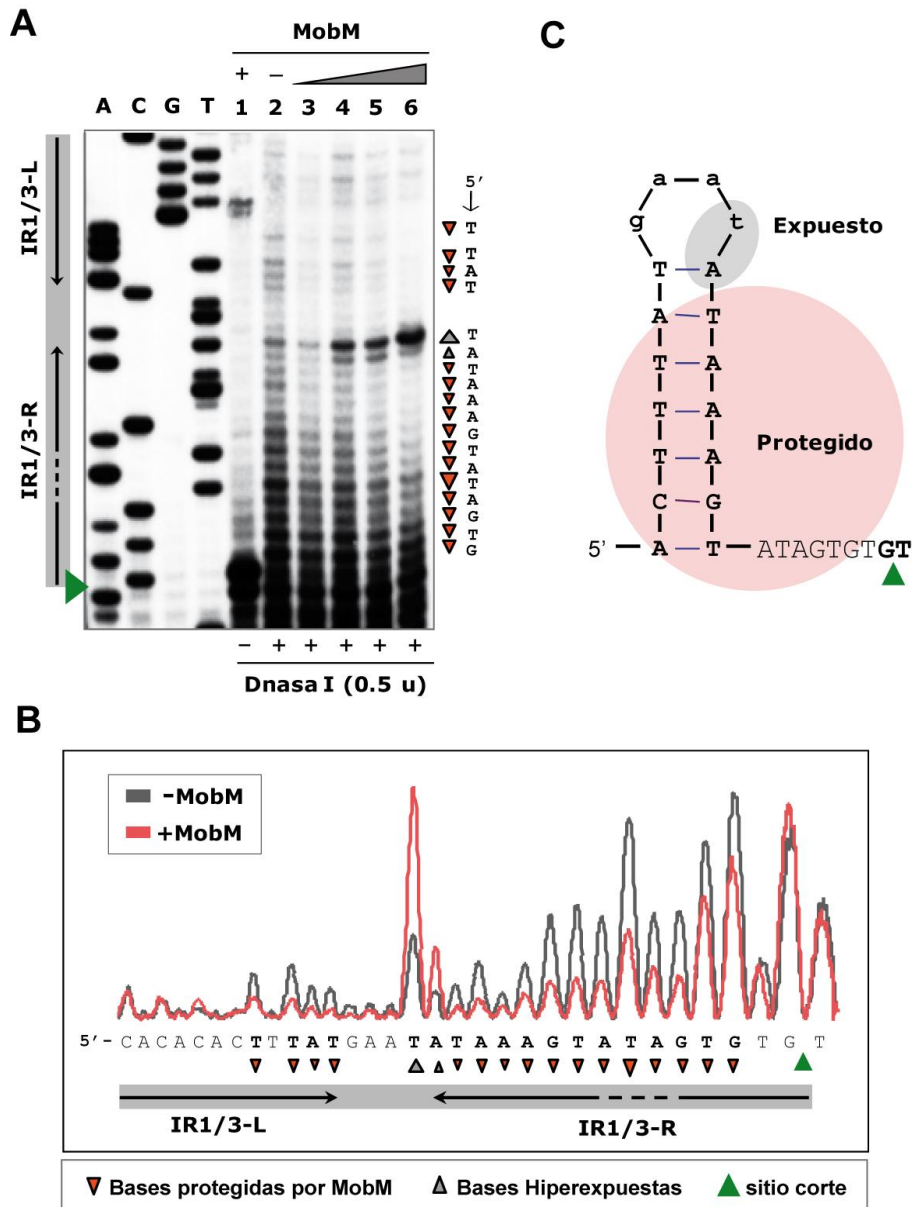


Figura 44. Footprinting con DNasa I de MobM unida al *oriT* sobre DNA superenrollado de pMV158 (11 nM).

A) Revelado del gel que muestra la región de la cadena codificante del *oriT* modificada por digestión con DNasa I (0.5 unidades) en presencia o ausencia de MobM. Calle 1 (control “NO-DNasa I”): influencia de MobM (2 μ M) sobre el DNA, en tampón de reacción de la DNasa I, que contiene Mg^{2+} (6 mM). Calle 2 (control “NO-MobM”): digestión del DNA con DNasa I, sin añadir MobM. Calles 3-6 (reacciones): se incubó el DNA con diferentes dosis de proteína MobM (0.25, 0.5, 1 y 2 μ M, respectivamente) en ausencia de catión, tratando posteriormente con DNasa I (2 min) en el tampón de reacción. Se realizaron reacciones de secuencia (calles A, C, G y T) con el mismo cebador que se empleó en las extensiones del DNA modificado. A la izquierda se muestra la localización del IR1/3 y del sitio de corte. **B)** Comparación entre los perfiles densitométricos de las calles 2 (curva gris; ausencia de MobM) y 6 (curva roja; presencia de MobM), sobre la secuencia correspondiente del *oriT* de pMV158. El área de cada uno de los picos (intensidad de las bandas) es proporcional al número de veces que se detiene la extensión del cebador, lo cual es una indicación del grado de digestión de las bases del DNA con DNasa I. Las bases protegidas (▼) o hiperexpuestas (▲) a la digestión por DNasa I en presencia de MobM, se indican a la derecha del gel en el panel A y bajo la secuencia del DNA en el panel B. **C)** Posible estructura del *oriT* tras la unión de MobM, indicando las regiones expuestas o protegidas frente a la acción de la DNasa I.

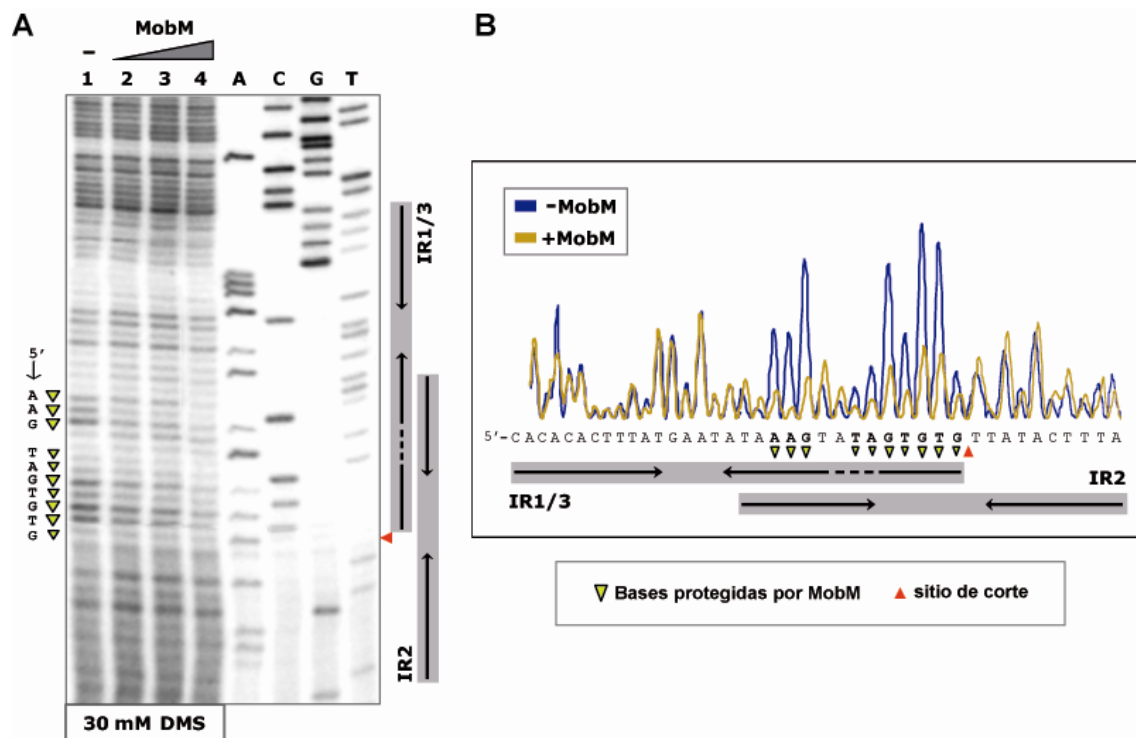


Figura 45. Footprinting con DMS de MobM unida al *oriT* sobre DNA superenrollado de pMV158 (11 nM).

A) Revelado del gel que muestra la región de la cadena codificante del *oriT* sensible a la metilación por DMS (30 mM) en presencia o ausencia de MobM. Calle 1 (control “NO-MobM”): tratamiento del DNA sin añadir MobM con DMS. Calles 2-4 (reacciones): se incubó el DNA con diferentes dosis de proteína MobM (0.5, 1 y 2 μ M, respectivamente) durante 25 min a 24 $^{\circ}$ C, y posteriormente se realizó el tratamiento con DMS (5 min) en el tampón de reacción. Se obtuvieron reacciones de secuencia (calles A, C, G y T) con el mismo cebador que se empleó en las extensiones del DNA modificado (oligonucleótido F1). A la derecha del gel se muestra el sitio de corte (cabeza de flecha roja) y la localización de los IRs que forman parte del *oriT*. **B)** Comparación entre los perfiles densitométricos de las calles 1 (curva azul; ausencia de MobM) y 4 (curva amarilla; presencia de MobM), sobre la secuencia correspondiente del *oriT* de pMV158. El área de cada uno de los picos (intensidad de las bandas) es proporcional al número de veces que se detiene la extensión del cebador, lo cual es una indicación del grado de metilación de las bases del DNA con DMS. Las bases protegidas (▼) de la metilación en presencia de MobM, se indican a la izquierda del gel en el panel A y bajo la secuencia del DNA en el panel B.

El segundo análisis de *footprinting* se realizó con DMS [(CH₃O)₂SO₂]. Este agente químico es capaz de metilar preferentemente las bases púricas, en concreto el átomo de N-7 de la guanina (por el surco mayor) y, con menor eficiencia, el N-3 de la adenina (en el surco menor). En las reacciones que se llevaron a cabo, las bases de la secuencia del *oriT* que no estaban protegidas por MobM fueron modificadas por metilación con DMS. La extensión posterior del oligonucleótido F1 con la T7 DNA polimerasa se bloqueó en cada uno de los puntos modificados, debido a que las bases metiladas no pueden formar puentes de hidrógeno con la cadena complementaria creciente. Los resultados mostraron protección en una región rica en As y Gs dentro

de la secuencia IR3-R (5'-AAGtaTAGTGT-3') en presencia de MobM (Fig. 45), lo cual se correlaciona con los datos de *footprinting* obtenidos con DNasa I. El grado de metilación en la secuencia intermedia del IR1/3 fue elevado (5'-TGAA-3'), tanto en ausencia como en presencia de MobM, lo que indicaría cierta distorsión del DNA en esa zona.

Por último se analizaron los efectos de la unión de MobM al *oriT* de pMV158 mediante *footprinting* con KMnO₄. Este agente de baja masa atómica (159 Da), presenta alta capacidad de oxidación de las bases pirimidínicas (timina>citosina), principalmente en regiones de DNA desapareado o distorsionado, o que se encuentran en la base de estructuras tipo tallo-lazo (Schlax *et al.*, 1995). Debido a que la secuencia del *oriT* es muy rica en timinas (39%; Fig. 39), la información que se pudo extraer de este ensayo fue muy útil para determinar la conformación de esta región en el DNA superenrollado de pMV158. Como se muestra en la Figura 46, en el perfil de sensibilidad al KMnO₄ del DNA de pMV158 libre de proteína (calle 1 y curva violeta en panel A y B, respectivamente), se observó una timina ubicada en la región intermedia de IR1/3 (5'-gaaTata-3') con un elevado índice de oxidación que indicaría la existencia de una estructura cruciforme de tipo IR1 o IR3. Más aún, se observaron ciertos niveles de oxidación en las timinas que se localizarían en el '*loop*' interno de la estructura IR3 (brazo derecho), la primera citosina que se localiza en el extremo 5' del brazo izquierdo de IR3 (5'-gagCac-3'), además de en la región que se extiende corriente arriba de la secuencia, lo cual apoyaría la idea de que en el DNA libre hay una dinámica de extrusión de IR3 (Fig. 46C). Cuando se analizó el perfil de oxidación con relaciones molares proteína:DNA 45:1 (calle 2 en Fig. 46A; curva verde en Fig. 46B), se observó un fuerte aumento de la reactividad frente a KMnO₄ de todas las timinas que se encuentran en el sitio de corte (5'-TGTG/TTATAC-3'), indicando que la unión de MobM provoca el desapareamiento de estas bases, generando así el sustrato monocatenario necesario para que haya reacción de corte. Aunque en menor grado, también se observó un nivel considerable de oxidación en misma la timina de la región intermedia de IR1/3 que se veía afectada fuertemente en ausencia de MobM.

Más aún, se observó que en presencia de MobM había una hiperoxidación en la primera adenina que se encuentra en el extremo 5' del brazo izquierdo de IR1 (5'-acActt-3'), mientras que en la citosina del extremo 5' de IR3-L (5'-gagCac-3') había una reducción en la sensibilidad a KMnO_4 , comparado con el DNA libre. Ello indicó que, bajo la unión de MobM, hay un desplazamiento de una estructura secundaria de tipo IR3 hacia una estructura de tipo IR1 (Fig. 46D).

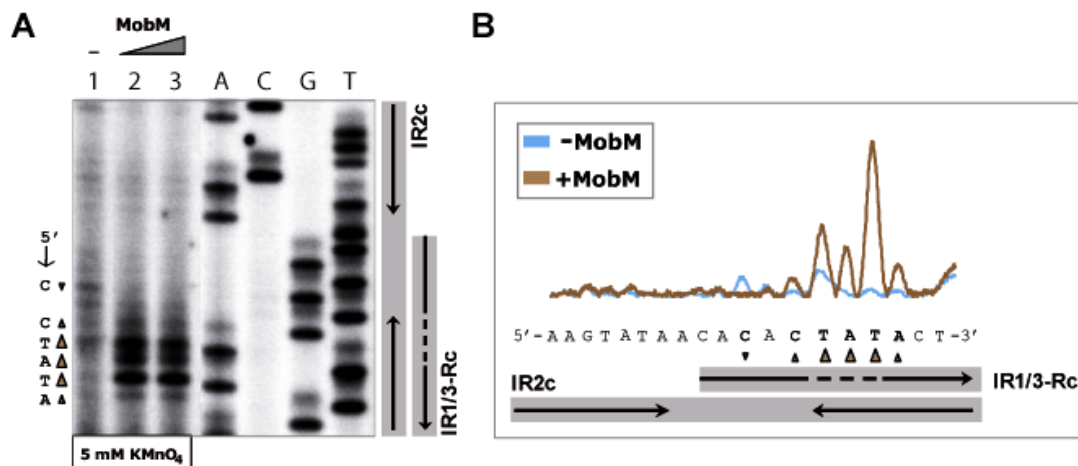


Figura 47. Footprinting con permanganato potásico (KMnO_4) de la cadena no-transferente del *oriT* de pMV158 (11 nM).

A) Revelado del gel que muestra la región de la cadena no-codificante del *oriT* modificada por oxidación con KMnO_4 (5 mM) en presencia o ausencia de MobM. Calle 1 (control “NO-MobM”): oxidación del DNA sin añadir MobM con KMnO_4 . Calles 2 y 3 (reacciones): se incubó el DNA con diferentes dosis de proteína MobM (1 y 2 μM , respectivamente) durante 25 min a 24°C , y posteriormente se realizó el tratamiento con KMnO_4 (5 min) en el tampón de reacción. Se obtuvieron reacciones de secuencia (calles A, C, G y T) con el mismo cebador que se empleó en las extensiones del DNA modificado (oligonucleótido PR2). A la derecha del gel se muestra la localización de los IRs que forman parte de la cadena complementaria del *oriT*. **B)** Comparación entre los perfiles densitométricos de las calles 1 (curva azul; ausencia de MobM) y 2 (curva marrón; presencia de MobM), sobre la secuencia correspondiente del *oriT* de pMV158. El área de cada uno de los picos (intensidad de las bandas) es proporcional al número de veces que se detiene la extensión del cebador, lo cual es una indicación del grado de oxidación de las bases del DNA con KMnO_4 . Las bases hipo- (\blacktriangledown) o hiper-oxidadas (\blacktriangle) en presencia de MobM se indican a la izquierda del gel en el panel A y bajo la secuencia del DNA en el panel B.

Cuando se realizó el mismo análisis de *footprinting* con KMnO_4 sobre la cadena complementaria del *oriT* (es decir, de la cadena que no se transfiere), se observó nuevamente una hipersensibilidad a la oxidación de las bases ubicadas en el brazo derecho complementario del IR3 en presencia de MobM (Fig. 47), lo cual indicó la existencia de un desapareamiento en esa zona del DNA tras la unión de la proteína. La combinación de estos datos con los obtenidos mediante EMSA con DNA

monocatenario hicieron pensar que la región del *oriT* que comprende al brazo derecho del IR2 no es tan relevante como el resto de la secuencia (IR1/3). Teniendo en cuenta las uniones débiles de MobM o MobMN199 por la secuencia IR2, los siguientes análisis en el estudio de las interacciones de la proteína se centraron en los oligonucleótidos IR3 y ORIT.

3.4. Estequiometría de unión entre MobMN199 y el *oriT*

El cálculo de la estequiometría de unión de MobMN199 permitió conocer cuantas unidades de proteína se unen a cada molécula de oligonucleótido IR3 u ORIT. Esta información fue imprescindible para analizar posteriormente las afinidades de la proteína MobMN199 por los mismos DNAs en configuración monocatenaria y, así, estimar las constantes de disociación (ver siguiente apartado).

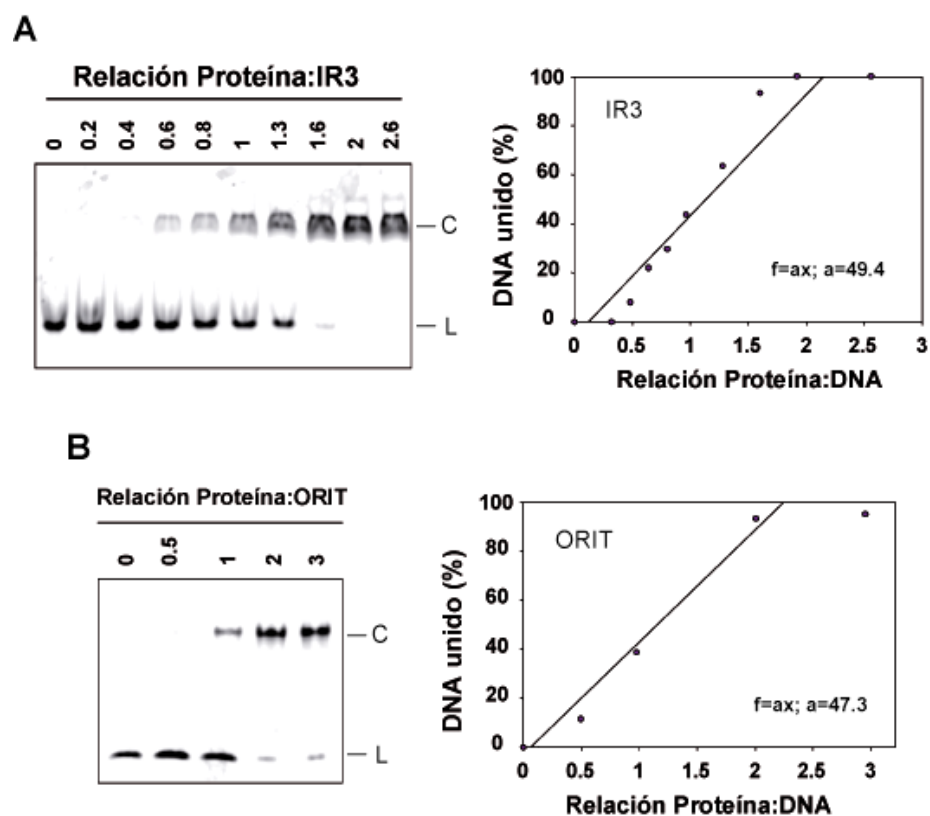


Figura 48. Estequiometría de unión de MobMN199 por los oligonucleótidos IR3 (A) y ORIT (B).

La resolución de los complejos formados a diferentes relaciones proteína:DNA, empleando una concentración total de 800 nM del oligonucleótido IR3 o 500 nM del oligonucleótido ORIT, permitió representar y estimar la cantidad de moléculas que forman parte en el complejo en función al porcentaje de DNA unido. El ajuste de los datos a una ecuación lineal, permitió el cálculo de la constante estequiométrica en todo el rango del análisis.

Las medidas estequiométricas consistieron en cuantificar los complejos DNA-proteína formados en función a las relaciones entre DNA y proteína en cada una de las reacciones del ensayo. Para trabajar en condiciones estequiométricas se emplearon concentraciones altas de DNA del oligonucleótido ORIT (5 nM marcado + 495 nM no marcado) o IR3 (8 nM marcado + 792 nM no marcado). Tras la representación gráfica de los datos se realizó el ajuste a una ecuación lineal ($f = ax$), en función al porcentaje de DNA unido (f) respecto a la relación proteína:DNA (x). De esta forma, se obtuvo una pendiente de la curva (a) que equivalía a una constante estequiométrica del 50%, tanto con IR3 como con ORIT (Fig. 48). Así, teniendo en cuenta que MobMN199 es un monómero (apartado 2.3, capítulo 2), se observó que para obtener un 100% de DNA unido, se necesitaba una relación proteína:DNA ≥ 2 ($f=100$, $a=50$, $x=2$). Por tanto, pudimos concluir que la estequiometría de unión por ambos oligonucleótidos era de 2:1, es decir dos protómeros de proteína por cada molécula de DNA. Se obtuvieron resultados similares cuando repetimos los mismos ensayos con la proteína MobM nativa (dimérica), indicando que la estequiometría de unión por las secuencias IR3 y ORIT equivalía a un dímero de proteína por molécula de DNA (no se muestra).

3.5. Afinidad de MobMN199 por oligonucleótidos

Tras haber calculado la estequiometría de unión de MobMN199 se procedió a las medidas de afinidad de la proteína por los oligonucleótidos IR3 y ORIT mediante EMSA. En este caso, y a diferencia de los cálculos estequiométricos, se emplearon concentraciones muy bajas (2 nM) de oligonucleótido marcado (fluoróforo Cy5) y se cuantificó el porcentaje de DNA que aparecía en forma de complejo según la adición de dosis crecientes de MobMN199 (Fig. 49). La constante de disociación (K_d) del complejo DNA-proteína se calculó mediante el ajuste de los datos según se indica en la metodología. Los resultados obtenidos indicaron que la constante de disociación (K_d) de MobMN199 es 60 nM, tanto para el oligonucleótido IR3 como para ORIT, lo cual indica la concentración de proteína en la que el 50% del DNA está unido. Estos datos reflejaron que MobMN199 reconoce la región de DNA que incluye el IR1/3 con alta afinidad ($K_d < 80$ nM). Sin embargo, la pérdida del extremo 5' de la secuencia del *oriT* (representado por IR2) supuso una disminución en la afinidad de unión de, al menos, 5 veces ($K_d > 320$ nM; Fig. 49B).

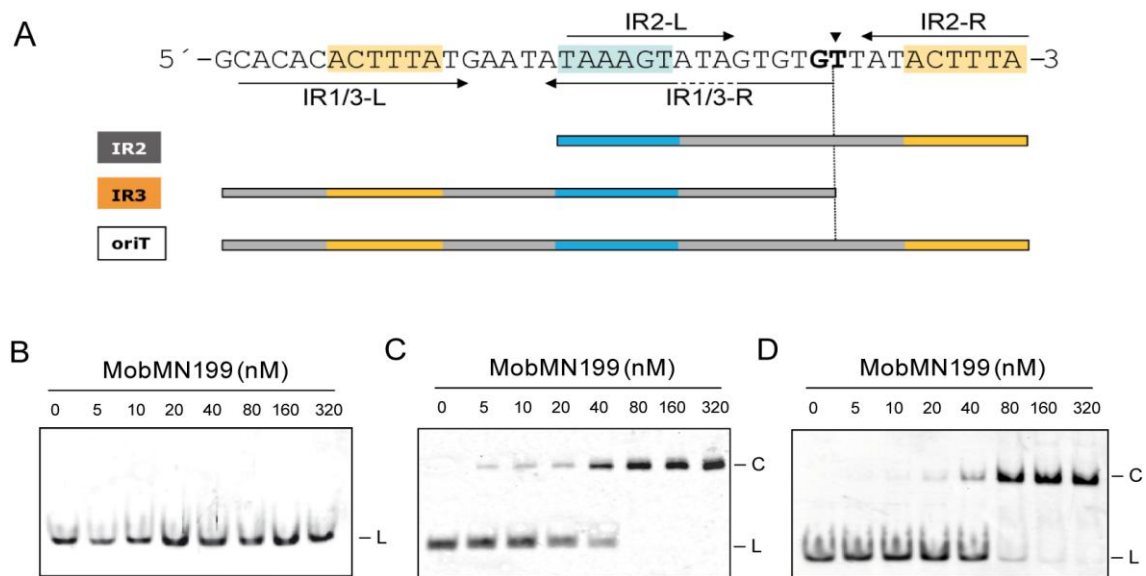


Figura 49. EMSA con MobMN199 y oligonucleótidos con la secuencia del *oriT*.

A) Esquema de los oligonucleótidos empleados. EMSA con los oligonucleótidos: **B)** IR2, **C)** IR3, y **D)** ORIT. Se prepararon mezclas que contenían una concentración fija de DNA marcado con el fluoróforo Cy5 (2nM) y diferentes cantidades proteína MobMN199. Tras incubar 20 min a 24°C, las muestras se analizaron en geles nativos de PAA (10%).

3.6. Definición *in vitro* del *oriT* mínimo en estado monocatenario

Uno de los aspectos importantes de este trabajo consistió en definir cuáles eran los requerimientos mínimos de la diana de la proteína MobM, empleando oligonucleótidos que incluían parte o la totalidad de la secuencia del origen de transferencia. Dado que: i) la estequiometría de unión de MobMN199 por IR3 y ORIT es 2:1; ii) la afinidad por ambos es idéntica, y iii) sólo se observó un único complejo DNA-proteína en los análisis por EMSA, se pensó que las secuencias reconocidas específicamente en estos oligonucleótidos debería ser la misma. Para estudiar esta hipótesis, se analizaron las afinidades de MobMN199 por oligonucleótidos marcados y no marcados mediante ensayos de competición. En todos los casos, para no dar preferencia a ninguno de los oligonucleótidos, primero se prepararon mezclas que contenían los dos tipos de DNA y luego se añadió la proteína. Concretamente se empleó una concentración fija de IR3-Cy5 (2nM) y cantidades crecientes de DNA no marcado, con la misma o con diferentes secuencias del *oriT* (Fig. 50), y luego se añadió la solución de proteína MobMN199 (80 nM).

Para eliminar en la medida de lo posible cualquier error experimental, todas las reacciones se realizaron simultáneamente con el mismo lote de proteína, los oligonucleótidos se cuantificaron en el mismo espectrofotómetro, y las carreras

electroforéticas se realizaron en la misma cubeta, con dos geles en paralelo. Asumiendo que el fluoróforo Cy5 no interfiere en la unión de la proteína y que, por tanto, la afinidad de la proteína es igual tanto por el oligonucleótido marcado como por el no marcado, se observó que el oligonucleótido IR3 (Fig. 51A) compite con la misma eficiencia que el oligonucleótido ORIT (Fig. 51B) por la unión de MobMN199 con IR3-Cy5. Por ello, para definir la secuencia mínima de unión de MobMN199, se realizaron nuevos ensayos de competición entre el IR3-Cy5 y una serie de oligonucleótidos competidores de menor longitud respecto a IR3. En los ensayos de competición se observó que un oligonucleótido que contuviera la secuencia IR1 más 8 nucleótidos hasta el sitio de corte (IR1+8) era capaz de competir por la unión de IR3-Cy5 (Fig. 51C) con la misma capacidad que los oligonucleótidos IR3 y ORIT. Sin embargo, no se observó competición cuando el oligonucleótido empleado solo contenía la secuencia IR1, el brazo derecho del IR3 (IR3-R), o 10 nucleótidos (10-NIC) a 5' del sitio de corte (Fig. 51D). Como se esperaba, no hubo desplazamiento en la unión entre MobMN199 y IR3-Cy5 cuando se utilizó el oligonucleótido competidor IR2 (no se muestra). Tampoco hubo competición cuando se usaron oligonucleótidos con la secuencia del brazo izquierdo de IR3 (IR3-L) o el brazo derecho de IR1 (IR1-R), incluso añadiendo altas concentraciones (>1 μ M) de los mismos (no se muestra).

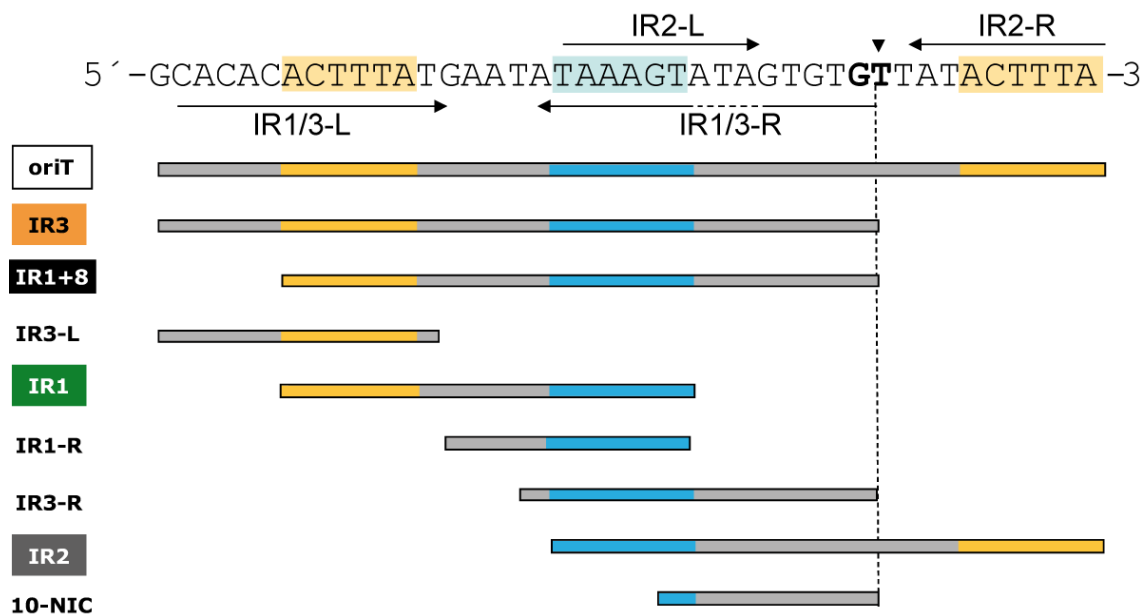


Figura 50. Esquema representativo de los oligonucleótidos empleados en la definición de la secuencia mínima del *oriT* de pMV158 reconocida por MobMN199 en conformación de cadena sencilla.

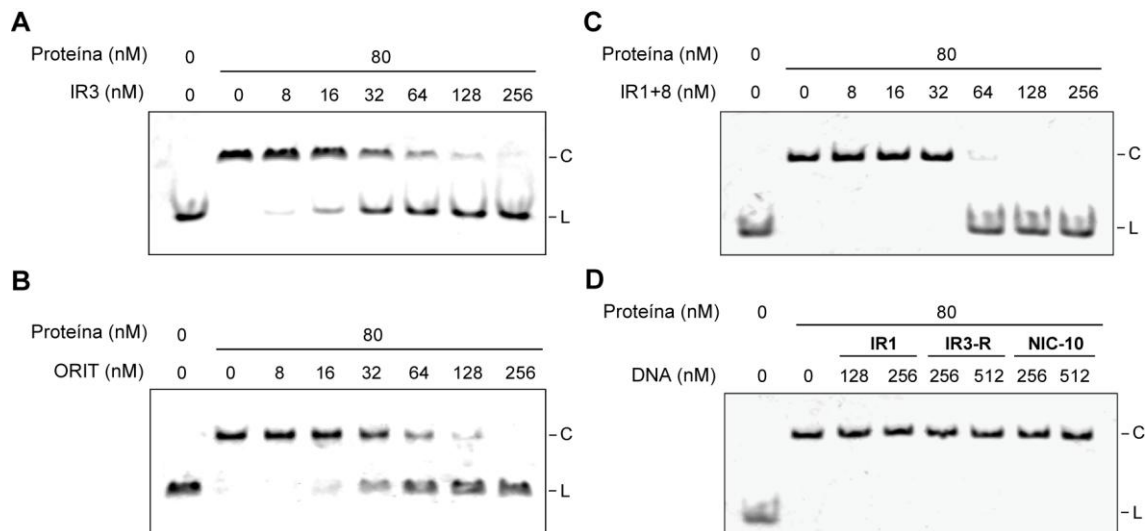


Figura 51. Competición entre IR3-Cy5 y el mismo oligonucleótido (A), el oligonucleótido ORIT (B), IR1+8 (C), o los oligonucleótidos IR1, IR3-R y 10-NIC (D).

Se prepararon mezclas que contenían una concentración fija de DNA marcado (2nM) y diferentes cantidades del oligonucleótido competidor sin marca. A continuación, se incubaron las muestras sin o con proteína MobMN199 (80 nM) durante 20 min a 24°C. Por último, se añadió sacarosa (4%, concentración final) a cada una de las muestras y se analizaron en geles nativos de PAA (10%).

Los ensayos de competición entre IR3-Cy5 y los oligonucleótidos no marcados IR3 o IR1+8 indicaron que las afinidades de la proteína MobMN199 por ambos oligonucleótidos era muy similar (K_d estimada para IR3 de 60 nM). Por ello, la capacidad de competición entre IR3 o IR1+8 con el oligonucleótido IR3-Cy5 se analizó mediante experimentos de cinética de disociación en un espectrofluorímetro (AVIV 105). En este caso, y a diferencia de los ensayos de competición mediante EMSA (en los que primero se mezclaban los dos tipos de oligonucleótidos implicados y luego se añadía la proteína), se dio preferencia al oligonucleótido marcado, incubando MobMN199 (80 nM) con IR3-Cy5 (4nM) durante 10 minutos. En estas condiciones todo el DNA estaría en forma de complejo con la proteína. Posteriormente se añadió un exceso de 100 veces de oligonucleótido no marcado (400nM) y se midieron los cambios en la intensidad total de fluorescencia a intervalos de 5 segundos. Se ha asumido que las interacciones DNA:proteína son dinámicas, de modo que cada evento de separación de los complejos formados por IR3-Cy5 y MobMN199 supondría la “captura” de la proteína libre por las moléculas en exceso de DNA no marcado. De esta forma, la intensidad de fluorescencia de las moléculas de IR3-Cy5 libres disminuye, debido a que su rotación es mayor en la solución y la luz se despolariza más rápidamente. Tras representar los datos se realizó un ajuste a un modelo que permitió calcular las constantes de velocidad de disociación. Los resultados mostraron

que IR1+8 ($K_1= 0.029 \text{ min}^{-1}$) compite con la misma capacidad que IR3 ($K_1= 0.030 \text{ min}^{-1}$) por la unión con MobMN199 (Fig. 52). Estos datos indicaron que el oligonucleótido IR1+8 representa la secuencia mínima de reconocimiento del *oriT* de pMV158 en forma monocatenaria, lo cual se correlaciona con la región de interacción de MobM sobre DNA superenrollado (ver apartado 3.3).

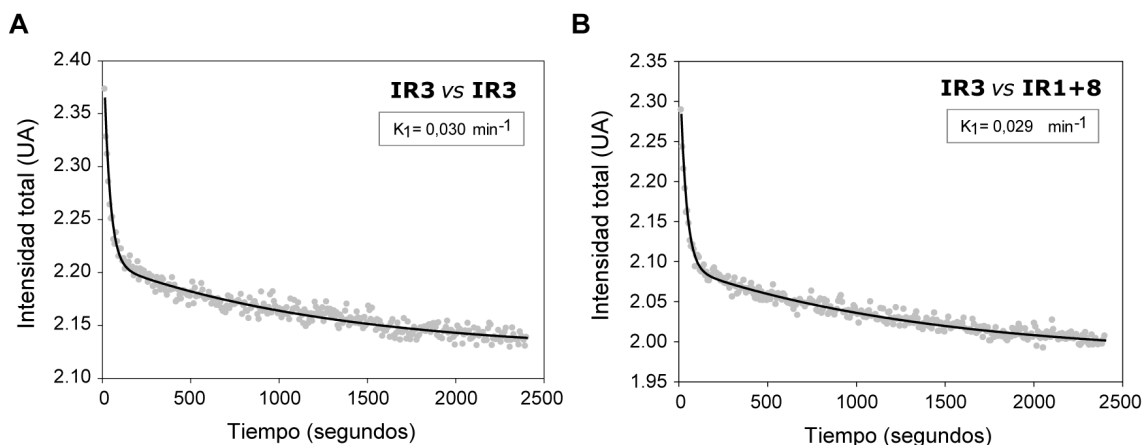


Figura 52. Cinética de competición de IR3 (A) e IR1+8 (B) sobre los complejos formados por MobMN199 y el oligonucleótido marcado IR3-Cy5.

3.7. Estabilidad térmica de MobMN199 unida a DNA

El efecto de la unión del DNA que contiene la secuencia mínima del *oriT* (oligonucleótido IR1+8) se analizó mediante DSC según se detalla en la sección de Métodos. El análisis de los resultados mostró un aumento significativo en la temperatura de fusión (T_m) de la proteína MobMN199 en presencia del DNA específico. Concretamente, la T_m se incrementó en más de 13°C respecto a un control en el que no se añadió DNA (desde 45.3 hasta 58.4°C). Además, como puede observarse en la Figura 53, el aumento en la T_m está asociado a un incremento significativo en la entalpía (ΔH), lo cual indica que existen interacciones entre residuos de la proteína y el DNA que aportan estabilidad al complejo.

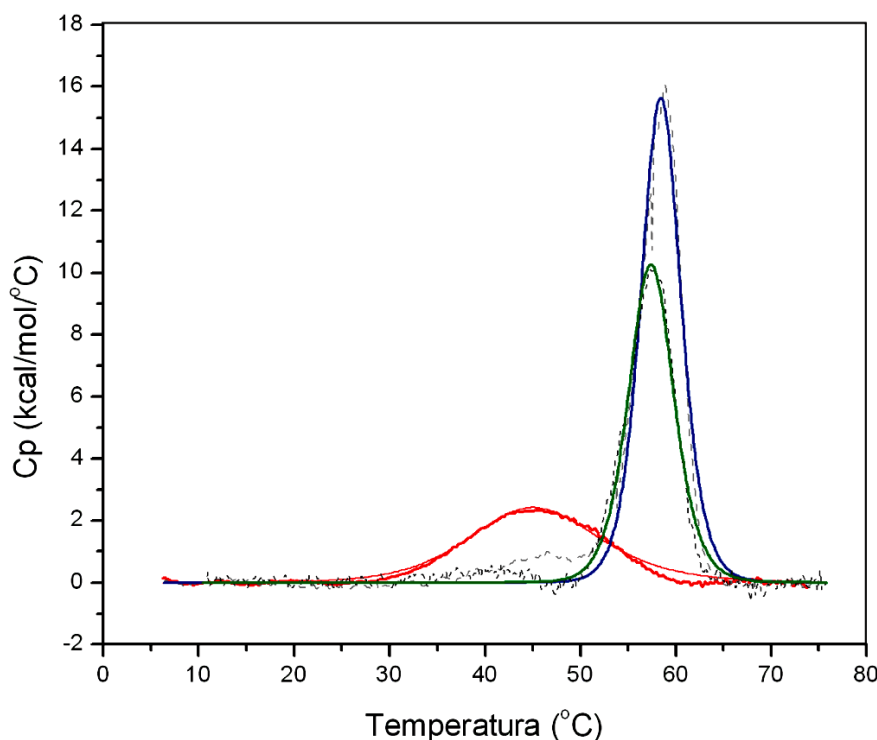


Figura 53. Influencia de la unión de DNA en la estabilidad térmica del dominio relaxasa de la proteína MobM.

Se muestran los perfiles de MobMN199 (89 μM , en rojo) y de los complejos MobMN199 con el oligonucleótido IR1+8 a una relación 2:1 (13.3:6.7 μM , en verde; 40:20 μM , en azul). Cp, capacidad calorífica.

3.8. Estructura tridimensional de MobMN199 unida a DNA

Los intentos para conseguir co-cristales de la proteína nativa MobM con DNA no tuvieron éxito. Sin embargo, se obtuvieron resultados favorables cuando se empleó la versión truncada MobMN199 y un oligonucleótido que contiene la secuencia definida previamente como el *oriT* mínimo. Como se demuestra en este capítulo, esta proteína se une a DNA que contiene el *oriT* y relaja DNA de pMV158 con la misma eficiencia que la proteína nativa. Concretamente, a partir del complejo MobMN199:IR1+8 se obtuvieron cristales con un grupo espacial $P2_12_12_1$, que difractaban a una resolución de 2,1 Å. En la estructura general de MobMN199 se alternan hélices- α con cadenas- β (Fig. 54), tal y como sugerían los datos de predicción de estructura secundaria (apartado 2.5, capítulo 2). Tras comparar la estructura tridimensional de MobMN199 con las relaxasas TrwC y TraI_F se observó una gran similitud en el plegamiento global (Fig. 55), con una lámina central compuestas por varias cadenas- β antiparalelas, flanqueada por las hélices- α .

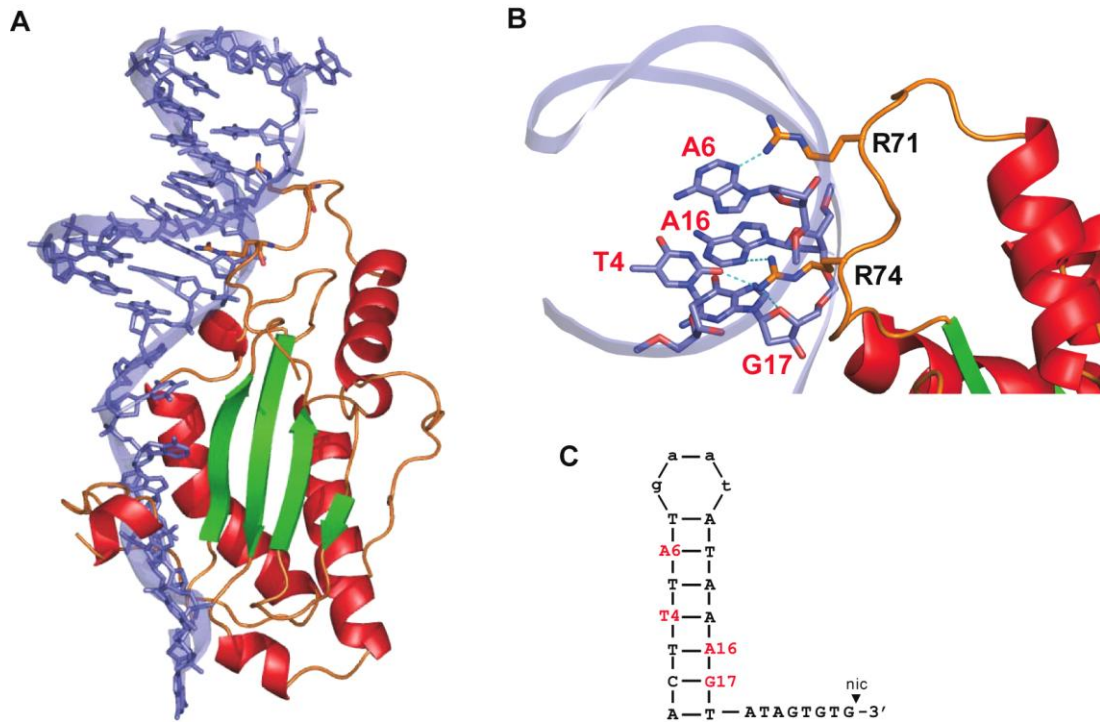


Figura 54. Estructura tridimensional de MobMN199 unida al oligonucleótido IR1+8.

A) Representación en forma de cintas del complejo DNA-Proteína. 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. **B)** Detalle del motivo de unión al surco menor del DNA mediante dos residuos de arginina (R71 y R74). Las bases del DNA implicadas en la interacción se destacan en rojo. **C)** Esquema de la estructura secundaria del oligonucleótido IR1+8, indicando las bases que interactúan con R71 y R74.

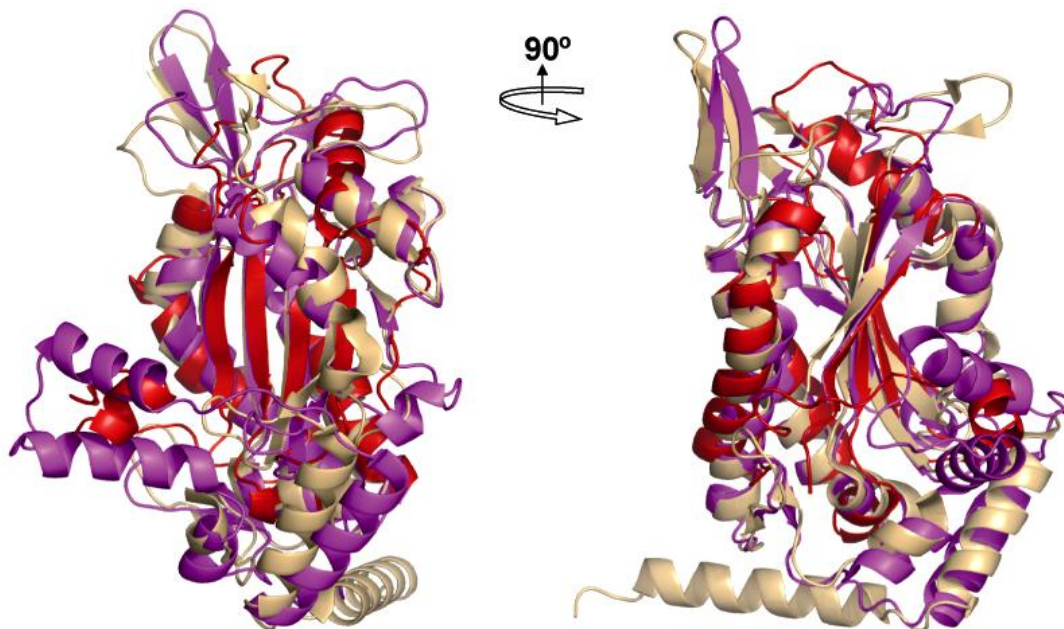


Figura 55. Comparación entre el plegamiento del dominio relaxasa de MobM (en rojo) con las proteínas TrwC (violeta) y Tral (marrón).

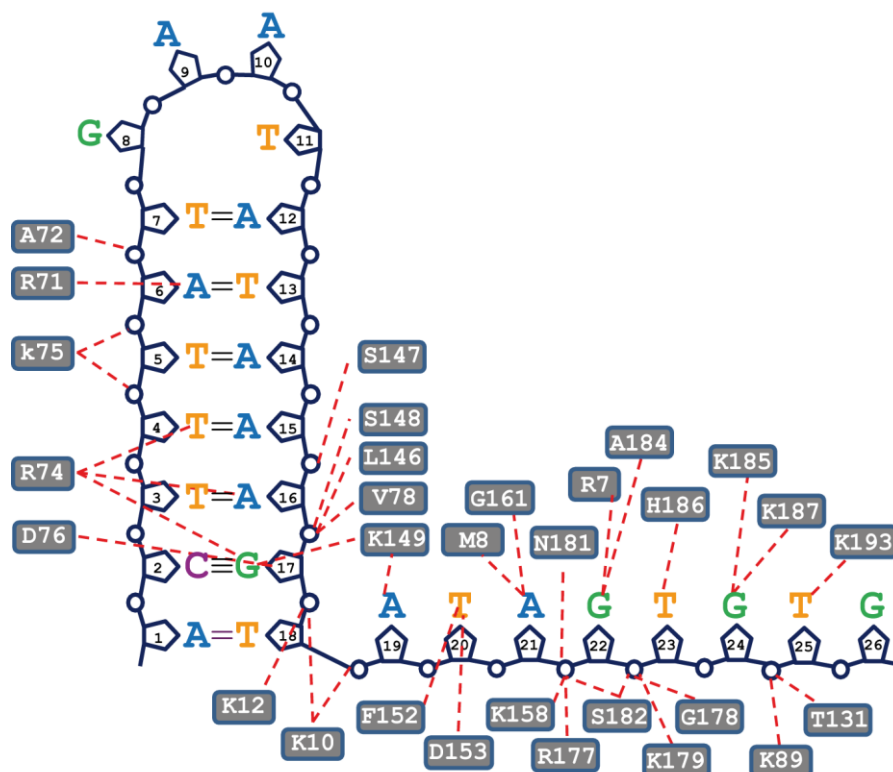


Figura 56. Mapa de interacciones entre MobM y el DNA del *oriT*.

Se indican los puentes de hidrógeno establecidos entre los residuos de MobM y las bases nitrogenadas o los enlaces fosfodiéster del esqueleto del DNA.

El complejo contiene un oligonucleótido de 26 nucleótidos (IR1+8; Fig. 54C), que corresponde a la secuencia del *oriT* de pMV158 definida como la diana mínima en experimentos anteriores (Figs. 51 y 52). Se han numerado las bases empezando en el extremo opuesto al sitio de corte, siendo la base 1 la más lejana al sitio de corte y la 26 la anterior al enlace que se forma entre el oxígeno O3' de G26 y el fosfato de T27 (este último no está presente). La estructura del DNA se caracteriza por tener una región de doble cadena (7 pb), debida a la horquilla que forma la repetición invertida IR1 con un bucle de 4 nucleótidos, y otra de cadena sencilla de 8 nucleótidos que va desde la A19 hasta la G26. El DNA cubre 2621 \AA^2 de la superficie proteica, lo que representa aproximadamente un 30% de la superficie total (8677 \AA^2). Esta extensa superficie de interacción se encuentra cargada positivamente y define un profundo surco a lo largo de una de las caras de la proteína en el cuál se sitúa la doble cadena de DNA. Las interacciones que se establecen con numerosos residuos, fundamentalmente mediante enlaces de hidrógeno, dan estabilidad al complejo en su conjunto (Fig. 56). Las argininas R71 y R74 forman puentes de hidrógeno con varias bases de la horquilla del DNA (Fig. 54B), aunque la región con mayor número de enlaces se encuentra en la región de cadena sencilla. No obstante, mientras que en

otras estructuras (TrwC y Tral_F; ver Fig. 10) esta zona de DNA monocatenario presenta un giro en forma de U para entrar en el núcleo de la proteína, el extremo 3' del oligonucleótido IR1+8 queda expuesto, fuera del entorno del centro activo. La implicación de este fenómeno en la actividad de corte de MobMN199 se discutirá más adelante.

3.9. Papel del residuo Y44 de MobM en el corte de DNA

En trabajos previos se había propuesto que el residuo de MobM implicado en el corte del DNA podría ser la tirosina ubicada en la posición 44 (Grohmann *et al.*, 1999), debido a su elevado grado de conservación en el motivo II del resto de relaxasas de la superfamilia MOB_V (Francia *et al.*, 2004). Sin embargo, una inspección a la estructura obtenida excluía casi totalmente la posibilidad de que la tirosina 44 sea uno de los residuos catalíticos, debido a su lejanía respecto al centro activo de la proteína (Fig. 57).

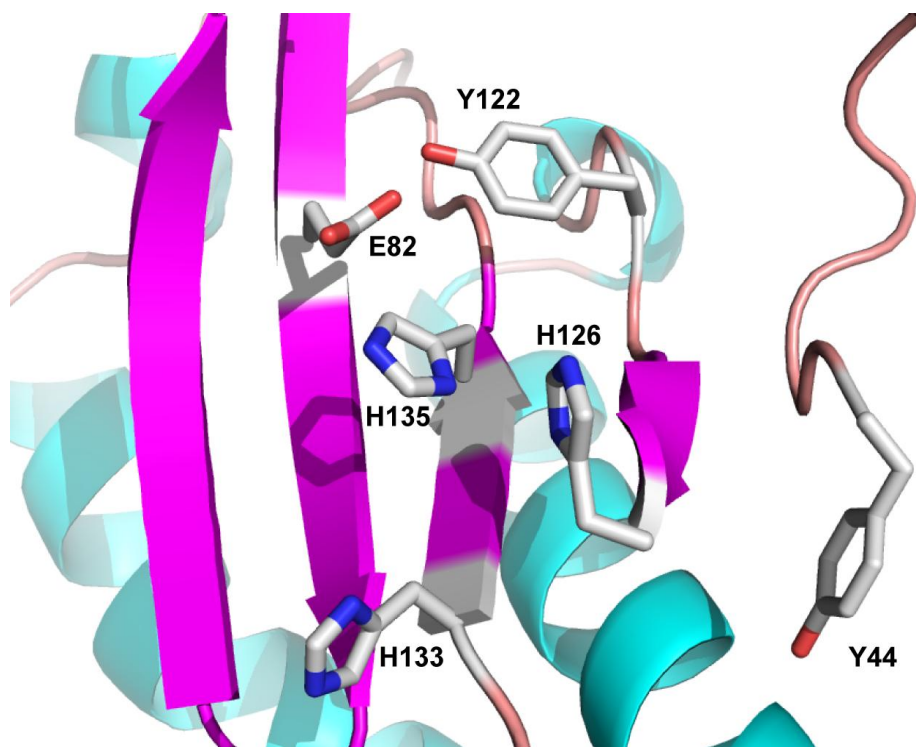


Figura 57. Centro activo de MobM.

Se indica la posición de las tres histidinas (H126, H133 y H135) del motivo de coordinación de metal, y la localización de las posibles tirosinas catalíticas (Y44 e Y122). El residuo E82 podría estar implicado en la sustracción del protón del grupo OH de Y122, convirtiéndolo en un potente nucleófilo.

Para verificar esta hipótesis, se decidió llevar a cabo la mutagénesis del residuo Y44 por una fenilalanina. Tras purificar la proteína MobM(Y44F) y realizar ensayos de actividad de corte sobre DNA superenrollado de pMV158, se observaron los mismos niveles de actividad en comparación a dosis equivalentes de la proteína nativa MobM (Fig. 58). Estos datos revelaron que Y44 no es el residuo catalítico. En el centro activo de MobM si que se pudieron observar las tres histidinas que forman parte del motivo III (H126, H133 y H135), conservados en todas las relaxasas e implicado en la coordinación de un átomo de metal divalente, esencial para la actividad de corte. Además, un análisis de los residuos que se encuentran en la región del centro activo desveló que Tyr122 está ubicada cerca del residuo Glu82 (Fig. 57). Estos datos hacen pensar que es este residuo quién podría sustraer el protón del grupo hidroxilo de Tyr122, la cual realiza el ataque nucleofílico al enlace fosfato del dinucleótido de corte (5'-GpT-3').

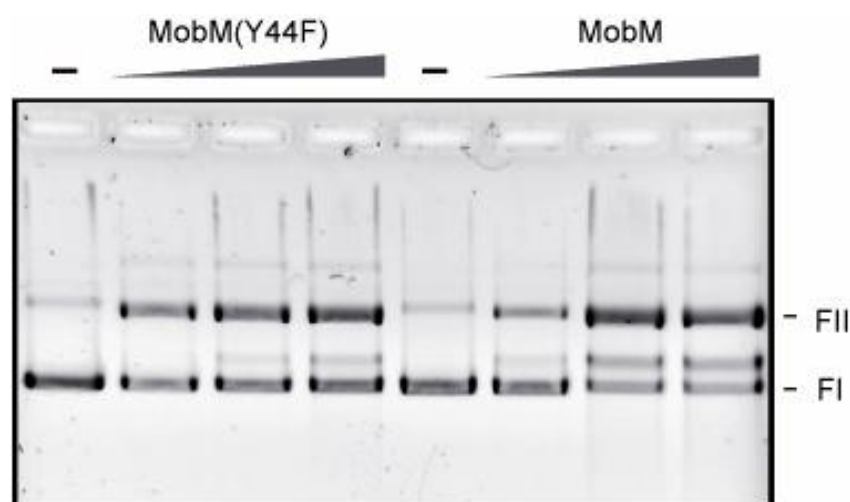


Figura 58. Actividad de corte de MobM(Y44F) y MobM.

En cada reacción se empleó una concentración de DNA de 8 nM y se incubó sin o con proteína (120, 240 o 480 nM) en presencia de $MnCl_2$ (15 mM) a 30 °C, 30 min. FI, DNA superenrollado; FII, DNA relajado por la actividad de corte.

3.10. Actividad de corte de MobMN199 sobre DNA monocatenario

La capacidad de MobMN199 para llevar a cabo la reacción de corte en presencia de $MnCl_2$ también se analizó con diferentes oligonucleótidos que incluían el sitio específico del *oriT* de pMV158. *A priori*, debido a que MobMN199 tiene la misma capacidad de corte sobre DNA superenrollado que la proteína silvestre, se esperaba obtener algún producto de corte con los nuevos sustratos de DNA monocatenario empleados. Sin embargo, en ninguno de los ensayos se observó reacción de corte (no

se muestra), lo cual podía indicar que las condiciones de reacción empleadas no eran las adecuadas. No obstante, atendiendo a la información de la estructura tridimensional de MobMN199 se observó que el extremo 3' del oligonucleótido empleado (IR1+8) quedaba muy alejado del centro activo. Precisamente, la base ubicada en el extremo 3' de ese DNA (Fig. 54C) corresponde con la guanina del dinucleótido de corte 5'-GpT-3'. Más aún, tras el análisis de otra estructura disponible en la base de datos para TrwC se apreció claramente cómo el extremo 3' del DNA unido realiza un giro y entra hacia el centro activo de la proteína. En la Figura 59, se puede observar como la región C-terminal del dominio relaxasa de TrwCN293 (293 aminoácidos) contiene tres hélices- α ($\alpha 8$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$) que dirigen la región monocatenaria del DNA hacia la lámina- β central donde se encuentran los residuos catalíticos implicados en el corte. No así, en MobMN199 esa región está desestructurada y permite que el extremo 3' del DNA quede libre.

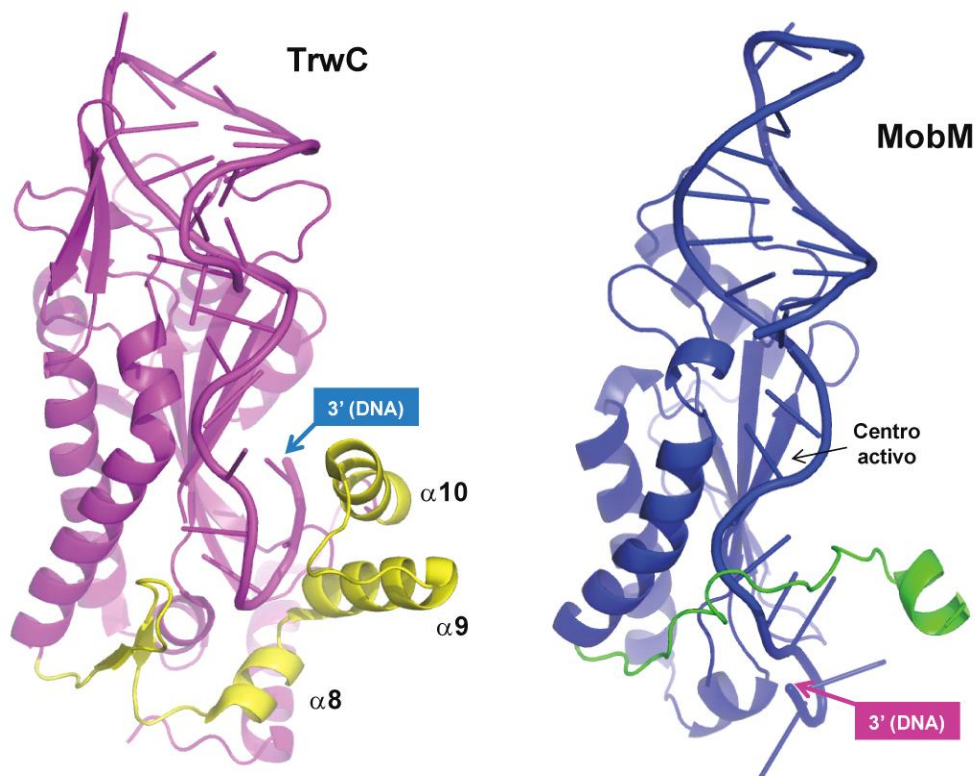


Figura 59. Comparación entre las estructuras de TrwCN293 (izquierda) y MobMN199 (derecha) indicando la posición de los extremos 3' de los respectivos DNAs empleados en la obtención de los cocristales.

Las tres hélices- α (en amarillo) que introducen el DNA hacia el centro activo de TrwC (PDB: 1QX0) no se encuentran disponibles en la versión truncada de MobMN199 (en verde).

Para verificar si la ausencia de dichas hélices- α en MobMN199 explicaba la inactividad sobre DNA monocatenario, se decidió construir y purificar una nueva versión de MobM, en la que se incluyeron los primeros 243 residuos de la proteína desde el extremo N-terminal (MobMN243; Fig. 60A). Los datos obtenidos por cromatografía de filtración en gel indicaron que, al igual que MobMN199, MobMN243 es un monómero (no se muestra). Cuando esta versión se empleó para realizar ensayos de actividad con un oligonucleótido de 23 bases (19-NIC-4) se observó un producto específico de corte de 19 bases (Fig. 60B). Sin embargo, MobMN199 no fue capaz de procesar este mismo sustrato (no se muestra). Estos resultados fueron concluyentes, indicando que MobMN199 solamente es capaz de procesar DNA superenrollado, pero no un DNA monocatenario que incluye el sitio de corte.

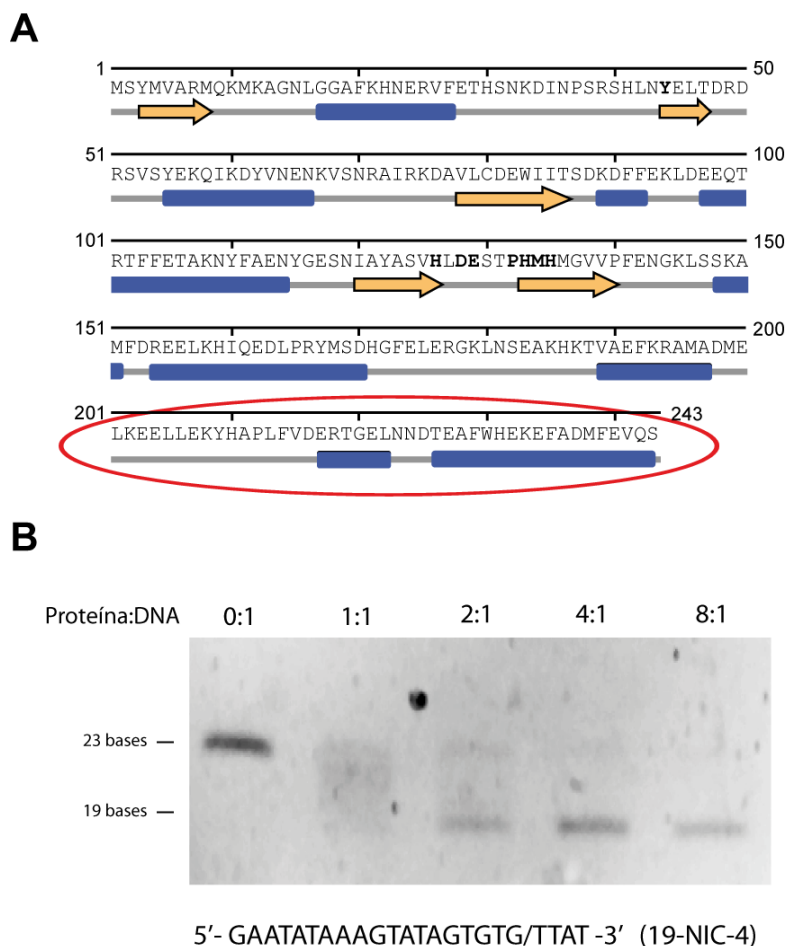


Figura 60. Propiedades de la proteína MobMN243.

A) Predicción del contenido y distribución de estructura secundaria de la proteína MobMN243, indicando la secuencia extra de aminoácidos respecto a MobMN199 (óvalo rojo), que incluye dos hélices- α más (cilindros azules). **B)** Actividad de corte de MobMN243 sobre el oligonucleótido 19-NIC-4. Las reacciones contenían una cantidad fija de DNA (200 nM) y de $MnCl_2$ (15 mM), y concentraciones crecientes de proteína MobMN243. Tras incubar a 37°C durante 30 min, se precipitó y limpió el DNA para analizarlo en geles PAA (20%) desnaturalizantes (8 M urea).

**CAPÍTULO 4: PAPEL DE LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN DE
CADENA RETRASADA EN LA TRANSFERENCIA DE pMV158**

El módulo de transferencia de pMV158 está flanqueado a 5' y 3' por dos orígenes de cadena retrasada, *ssoU* y *ssoA*, respectivamente. Se ha demostrado que el origen *ssoA* solo es eficaz en la replicación de pMV158 cuando reside en *S. pneumoniae* y que el origen *ssoU* es capaz de actuar como señal de conversión en otros géneros, tanto de bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*), como Gram negativas (*E. coli*). Todo ello ha hecho pensar que el origen *ssoU* puede tener un papel importante en la diseminación plasmídica mediante transferencia horizontal, aunque hasta el momento no habían evidencias experimentales que lo demostraran (del Solar *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1999). Las eficiencias de transferencia conjugativa de varios mutantes en los *sso* de pMV158 entre diferentes estirpes bacterianas se analizaron mediante un protocolo de conjugación en placas de 96 pocillos (Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009a). Además, se estimó el número de copias plasmídicas y se midieron las cantidades relativas de especies monocatenarias (ssDNA) en las células que habían adquirido las variantes en los *sso* del plásmido pMV158 (Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009b).

4.1. Construcción de plásmidos deficientes en la actividad de los orígenes de cadena retrasada

Como punto de partida se construyeron diferentes derivados plasmídicos de pMV158 cuyos *sso* carecieran de sus dos regiones funcionales, la secuencia RS_B (donde se une la RNAP del huésped) y la secuencia CS-6 (donde para la síntesis del cebador de RNA). Según el modelo de transferencia de pMV158, durante la conjugación el origen *ssoA* es el primero que entra en la célula receptora mientras que *ssoU* se encuentra en la última región del DNA transferido (Figs. 21 y 61). El análisis estructural de ambos orígenes ha demostrado su capacidad para formar estructuras secundarias complejas de tipo tallo-lazo en DNA monocatenario (intermediario de la replicación del plásmido), donde la secuencia RS_B está parcialmente anillada y la secuencia CS-6 queda desapareada en el lazo de la horquilla (Fig. 20). Dado que *ssoA* es el origen de cadena retrasada mejor estudiado, como material de partida se utilizó un plásmido no transferible derivado de pMV158 (llamado pLS1-G3G7) que posee una serie de mutaciones puntuales ubicadas en las regiones CS-6 y RS_B que anulan totalmente su función. Como se indica en la Figura 61, se introdujo un cambio de 6 nucleótidos en la región desapareada de la secuencia RS_B (mutación G7) y otro cambio de 9 nucleótidos en la secuencia CS-6 (mutación G3). Aunque, según las predicciones mediante análisis computacional, estos cambios no alteran el potencial

de formación de estructura secundaria en *ssmA*, tanto la capacidad de unión de la RNAP como la terminación de la síntesis del pRNA estaban afectadas (Kramer *et al.*, 1997). Así, mediante clonaje del fragmento pequeño *EcoRI* de pMV158 en el plásmido pLS1G3G7, conseguimos restaurar las funciones de movilización (*oriT* y gen *mobM*) y el origen *ssmU*, resultando así un plásmido que hemos denominado pMV158G3G7, en el que *ssmA* no es funcional (Fig. 61; Tabla 4).

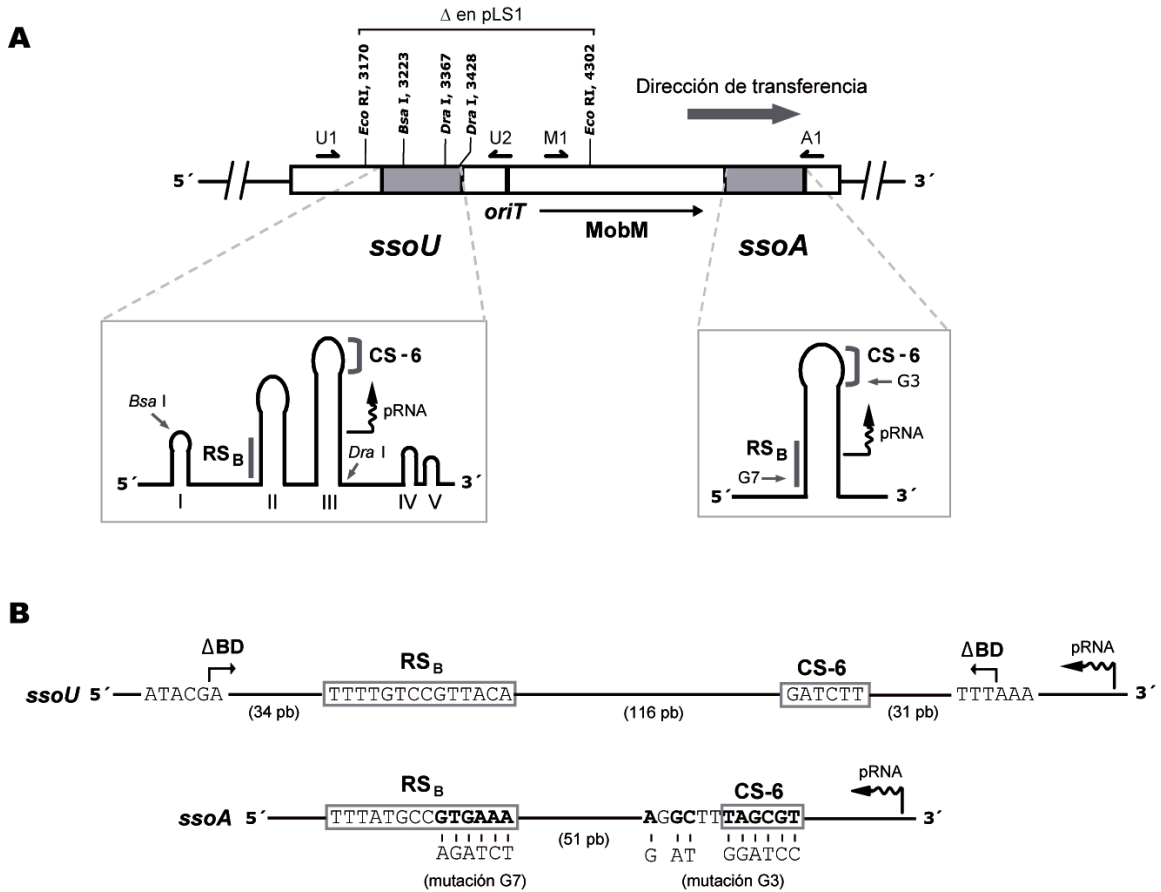


Figura 61. Características de los mutantes en los *ssm* de pMV158.

A) Mapa del módulo de transferencia indicando los sitios de restricción relevantes, las posiciones relativas de los *ssm* y la dirección de transferencia del DNA. **B)** Representación esquemática de las estructuras de los orígenes *ssmA* (izquierda) y *ssmU* (derecha), destacando la posición de las secuencias *RS_B* y *CS-6*. También se indican las mutaciones G3G7 introducidas en *ssmA* o los sitios de restricción empleados para eliminar el *ssmU*.

Por otro lado, teniendo en cuenta que el *ssmU* no se ha caracterizado con tanto detalle como el *ssmA*, se decidió construir un derivado del plásmido pMV158 en el que las regiones *RS_B* y *CS-6* fueran eliminadas completamente mediante deleción. Para ello, tras cortar con las enzimas de restricción adecuadas (*BsaI* y *DraI*) y rellenar los extremos 5' protuberantes, se religó el DNA consiguiendo un derivado de pMV158 con

una delección de 205 pb que incluía las horquillas I, II y III (Fig. 61). El plásmido resultante se denominó pMV158 Δ BD y carecía de las dos secuencias, *a priori*, más importantes del origen *ssuU* (RS_B y CS-6). A su vez, mediante una estrategia de intercambio de los fragmentos *EcoRI* grande (4.4 Kpb) y pequeño de pMV158 (1.1 Kb), se obtuvo un doble mutante combinando el plásmido pMV158G3G7 con pMV158 Δ BD, resultando un plásmido en que ninguno de los *ssu* son funcionales (pMV158G3G7 Δ BD).

4.2. Protocolo de conjugación en filtro con placas multipocillo

Para analizar los efectos de las mutaciones en los *ssu* de pMV158 en la transferencia plasmídica, se planteó la puesta a punto de un sistema de conjugación en filtro con placas de 96 pocillos (Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009a), lo que suponía un substancial avance con respecto a los métodos 'tradicionales' en los que se usa un filtro por cada ensayo de conjugación. Como soporte de conjugación se utilizaron placas multipocillo estériles con un filtro de 0.22 μ m acoplado en la base (Millipore). El procedimiento detallado se explica en la sección de materiales y métodos (apartado 10.2) y se ha representado de forma esquemática en la Figura 62.

Como donadores se utilizaron dos cepas de *S. pneumoniae*, ambas portadoras del plásmido pAM β 1 (autotransferible): i) *S. pneumoniae* 708, auxótrofa para maltosa y portadora del plásmido pMV158; y ii) *S. pneumoniae* R61, portadora del plásmido pMV158GFP (Tabla 2). Este último es un derivado de pMV158 que conserva la capacidad de transferencia y que porta el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor P_M del operón *malMP* (Nieto & Espinosa, 2003). Las cepas *S. pneumoniae* MP3008 y *Enterococcus faecalis* OG1RF se usaron como receptores en los ensayos de conjugación intra- e interespecífica, respectivamente. La expresión del gen *gfp* en pneumococos es inducible cuando las células se crecen en medio suplementado con maltosa y está reprimida en presencia de sacarosa o glucosa en un fondo genético *malR*⁺ (Nieto *et al.*, 2001). En este sentido, independientemente de la fuente de carbono utilizada como sustrato, la expresión será constitutiva en *E. faecalis* ya que esta especie carece de un análogo funcional de la proteína MalR de *S. pneumoniae*.

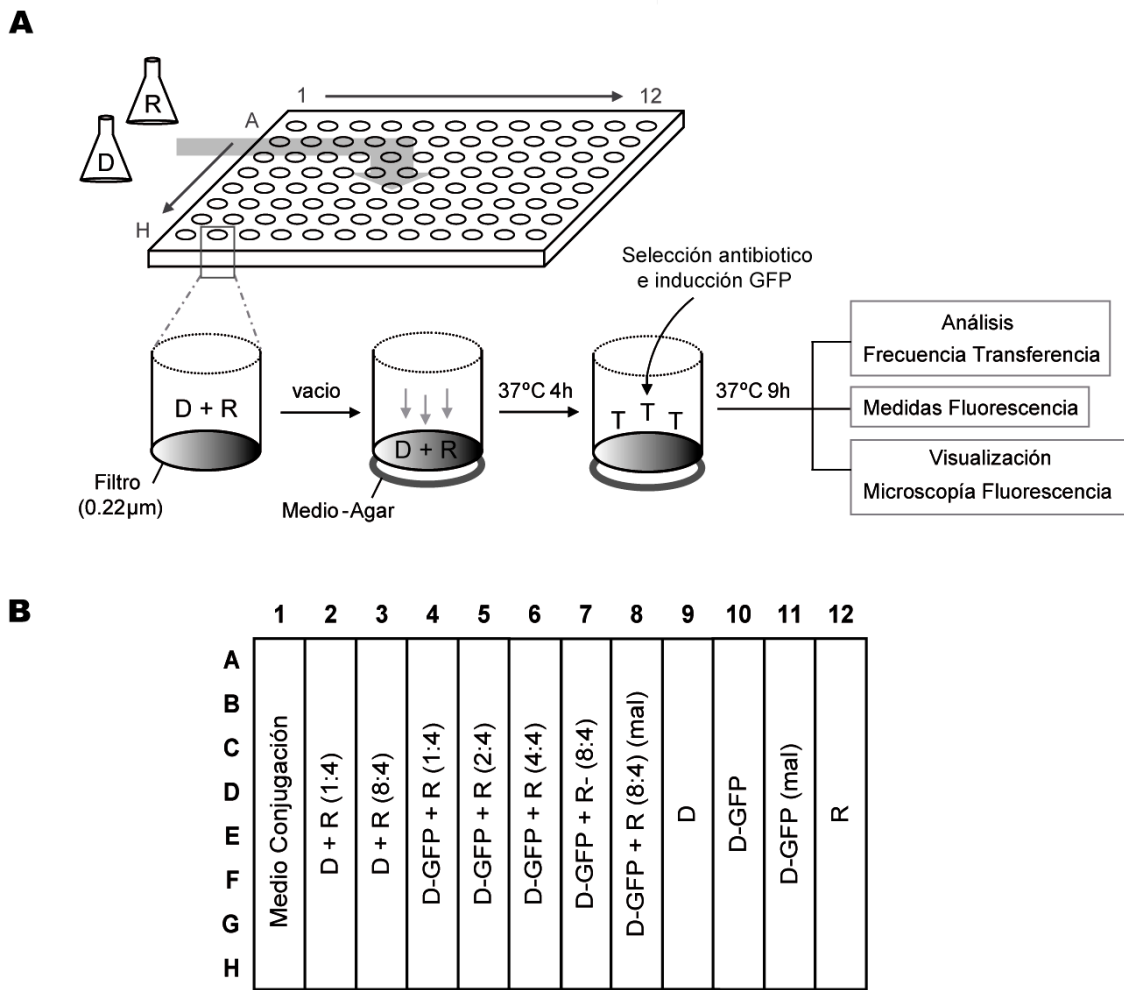


Figura 62. Procedimiento experimental (A) y esquema de la distribución (B) de los ensayos de conjugación en filtro con placas multipocillo.

A) Diferentes mezclas de cultivos de células donadoras (D) del plásmido pMV158 o pMV158GFP con células receptoras (R), se dispusieron en los correspondientes pocillos de la placa. Tras aplicar vacío, las células quedan depositadas sobre el filtro (0.22 µm) que hay en la base de cada pocillo. La placa se coloca sobre una base de agar y se incuba a 37 °C durante 4 horas. Los receptores que hayan adquirido el plásmido pMV158 (es decir, los transconjugantes, T) se seleccionaron por la presencia de los antibióticos adecuados; los transconjugantes con pMV158GFP se seleccionaron, además, para la expresión de GFP mediante incubación (9 horas a 37 °C) en medio con maltosa. Pasado este periodo, se procedió al análisis de las frecuencias de transferencia plasmídica mediante siembras en placa, cuantificación de la intensidad de fluorescencia de GFP en un espectrofluorímetro, y visualización de las células en un microscopio confocal de epifluorescencia. **B)** En los 8 pocillos (A-H) de cada columna (1-12) se filtraron 100 µl del cultivo receptor (R) y/o 25, 50, 100 o 200 µl del cultivo donador del plásmido pMV158 (D) o pMV158GFP (D-GFP). En los ensayos de transferencia inter-específica, para la selección de los transconjugantes se empleó un medio de cultivo con sacarosa, con excepción de las columnas 8 y 11, en las que se empleó maltosa (inducción de GFP en el donador). En el ensayo intra-específico, se invirtió el orden, empleando un medio con maltosa, salvo en las columnas 8 y 11, en las que se empleó sacarosa.

De acuerdo con resultados previos (Nieto & Espinosa, 2003), las frecuencias de conjugación observadas con pMV158 y pMV158GFP fueron similares, indicando que la inserción del gen *gfp* no interfiere con la funcionalidad del sistema de movilización. Además, las frecuencias de transferencia observadas fueron proporcionales al incremento en las relaciones donador:receptor empleadas en el ensayo (Tabla 10). En el caso de las conjugaciones intra-específicas, solamente se observó un aumento en la señal fluorescente bajo condiciones de inducción (cultivos crecidos con maltosa). Sin embargo, en las conjugaciones inter-específicas, el aumento de la señal fluorescente fue directamente proporcional a las frecuencias de transferencia, tanto en cultivos crecidos con maltosa como con glucosa. No obstante, la expresión de GFP en las células donadoras en presencia de glucosa podría reducir la eficiencia de transferencia, como puede observarse en la Tabla 10. En el control de conjugación en el que el plásmido transferible es pMV158 (sin el gen *gfp*), se observaron niveles de fluorescencia basales y no hubo diferencias en la intensidad independientemente del volumen de cultivo empleado.

Tabla 10. **Transferencia intra- e inter-específica de pMV158 y pMV158GFP.**

Donador/ Plásmido	Fuente ^a	D/R ^b	Receptor <i>S. pneumoniae</i>		Receptor <i>E. faecalis</i>	
			Fluorescencia	Transferencia ^c (x10 ⁻⁵)	Fluorescencia	Transferencia ^c (x10 ⁻⁵)
708/ pMV158	Sacarosa	1/4	3.8 ± 1.3	0.4 ± 0.1	7.8 ± 2.3	1.1 ± 0.3
		8/4	5.5 ± 2.1	2.2 ± 0.7	3.1 ± 1.1	7.6 ± 1.5
		4/(-)	4.9 ± 2.0	N.D.	12.8 ± 3.0	N.D.
R61/ pMV158GFP	Sacarosa	1/4	N.A.	N.A.	9.8 ± 2.7	0.9 ± 0.2
		2/4	N.A.	N.A.	26.1 ± 5.6	1.5 ± 0.4
		4/4	N.A.	N.A.	110.3 ± 13.8	3.7 ± 0.9
		8/4	7.7 ± 4.1	1.2 ± 0.8	350.6 ± 23.3	8.9 ± 1.6
		4/(-)	2.7 ± 1.3	N.D.	10.1 ± 3.4	N.D.
R61/ pMV158GFP	Maltosa	1/4	4.8 ± 3.3	0.2 ± 0.06	N.A.	N.A.
		2/4	12.6 ± 3.4	0.6 ± 0.1	N.A.	N.A.
		4/4	21.7 ± 3.8	1.0 ± 0.6	N.A.	N.A.
		8/4	36.6 ± 9.6	2.6 ± 0.6	63.5 ± 7.6	4.4 ± 1.2
		4/(-)	7.2 ± 2.8	N.D.	0.7 ± 1.1	N.D.
No donador	Sacarosa	(-)/4	1.2 ± 1.8	N.D.	4.2 ± 2.0	N.D.

^aCultivos crecidos en sacarosa o maltosa (represión o inducción de la síntesis de GFP en células donadoras de *S. pneumoniae* R61, respectivamente). ^bMezclas de 25, 50, 100 o 200 µl dador (D) con 100 µl del receptor (R), ambos a 5x10⁸ células/ml; (-) indica que no se añadió donador o receptor. ^cFrecuencia de transferencia determinada como el ratio entre el número de células transconjugantes y el número de células receptoras. En los controles (sin donador o receptor), no se detectaron colonias transconjugantes (N.D.). N.A., no analizado.

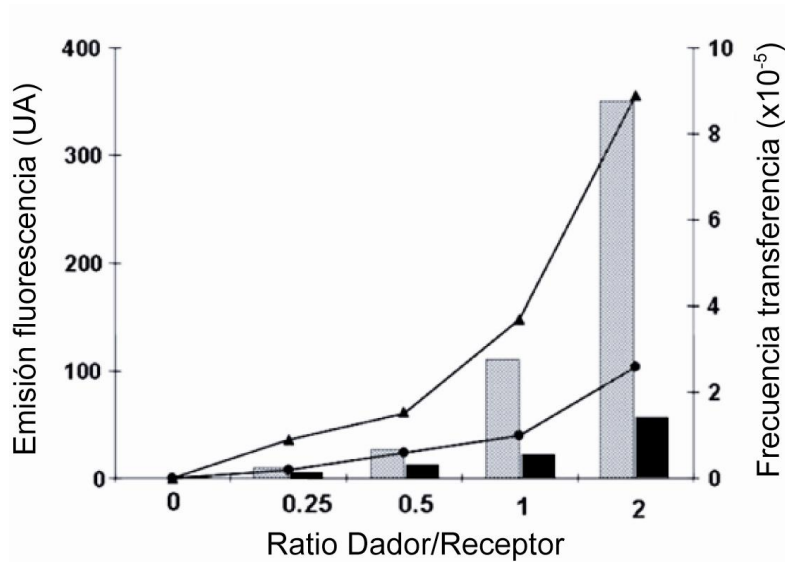


Figura 63. Correlación entre emisión de fluorescencia y frecuencia de transferencia de pMV158GFP.

La fluorescencia en pneumococos o enterococos se representa con barras negras o grises, respectivamente. Las curvas indican las frecuencias de transferencia de pMV158GFP hacia *S. pneumoniae* (●) o *E. faecalis* (▲) en función a las relaciones Donador:Receptor. Las desviaciones estándar se indican en la Tabla 10.

Dado que *S. pneumoniae* es microaerófilo y a que la fluorescencia de la proteína GFP es dependiente de la tensión de oxígeno, la intensidad de la señal fluorescente en células con pMV158GFP no fue tan elevada como en *E. faecalis*. De hecho, la visualización de las células mediante microscopía confocal de fluorescencia mostró unos niveles más altos en enterococos con pMV158GFP que en pneumococos con el mismo plásmido (Figs. 63 y 64).

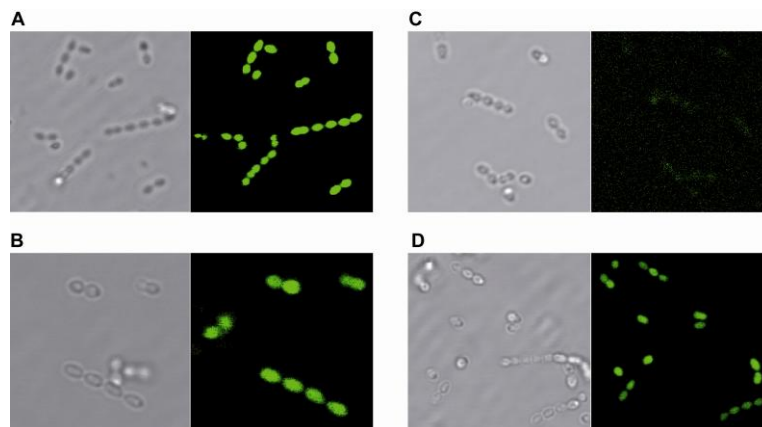


Figura 64. Expresión del gen *gfp* en células portadoras del plásmido pMV158GFP.

Microscopía de contraste de fase y de fluorescencia de células de *E. faecalis* (A y B) y *S. pneumoniae* (C y D) expresando GFP después de crecer en sacarosa (A y C; represión del promotor P_M en pneumococos) o en maltosa (B y D; inducción de P_M).

4.3. Análisis de la eficiencia de transferencia en los mutantes *sso*

Para estudiar la importancia de los *sso* durante la transferencia conjugativa, se transformó la estirpe 708 de *S. pneumoniae*, portadora del plásmido autotransferible pAM β 1, con cada uno de los plásmidos construidos (pMV158 y mutantes deficientes en la actividad *sso*). Estas estirpes se emplearon como donadoras en los ensayos de conjugación en placas multipocillo. En los experimentos de conjugación intra-específica se empleó como bacteria receptora la estirpe MP3008 de *S. pneumoniae* (resistente a novobiocina, Nov^R). Cuando se analizaron las eficiencias de conjugación del doble mutante (*ssoA*⁻*ssoU*) se observó que la frecuencia disminuye cien veces (Fig. 65), lo cual era de esperar teniendo en cuenta que el número de copias del plásmido en las células dadoras era mucho menor (ver más abajo) que en los mutantes individuales o en el plásmido silvestre. Sin embargo, en el caso de los mutantes individuales, se observó que independientemente del origen de cadena retrasada afectado, los niveles de transferencia eran similares entre los mutantes en los *sso* y el plásmido silvestre (pMV158), con una eficiencia de conjugación de 10⁻⁵ (transconjugantes/receptor). Ello indicó que en ausencia de uno de los *sso*, tanto el *ssoA* como el *ssoU* son señales óptimas para la conversión de ssDNA en dsDNA cuando pMV158 se transfiere entre dos células de pneumococos. Además, estos resultados demuestran que la delección de 205 pb que comprende gran parte del *ssoU*, no afecta a la funcionalidad (i.e. expresión del gen *mobM*) del módulo de transferencia.

Encontramos un panorama diferente en los experimentos de conjugación inter-específica. En este caso, se empleó como receptora la estirpe OG1RF de *E. faecalis* (resistente a rifampicina, Rif^R). Los resultados obtenidos mostraron que el proceso de conjugación no se encuentra afectado cuando el origen *ssoA* es funcionalmente deficiente (pMV158G3G7), con una frecuencia de transferencia de 10⁻⁴ (Fig. 65). Estas frecuencias son iguales a las obtenidas para el plásmido silvestre. Estos resultados hicieron suponer que la presencia del otro origen de cadena retrasada, *ssoU*, estaba actuando como señal para la síntesis de la cadena retrasada. No obstante, cuando los ensayos se realizaron utilizando el derivado de pMV158 en el que se eliminó el origen *ssoU* (pMV158 Δ BD), la frecuencia de conjugación disminuyó de forma significativa (30 veces), duplicándose cuando se empleó el doble mutante pMV158G3G7 Δ BD (Fig. 65). Estos resultados confirman que el origen *ssoU* es un elemento esencial en la conversión del DNA monocatenario a bicatenario cuando pMV158 se transfiere desde pneumococos a *E. faecalis*.

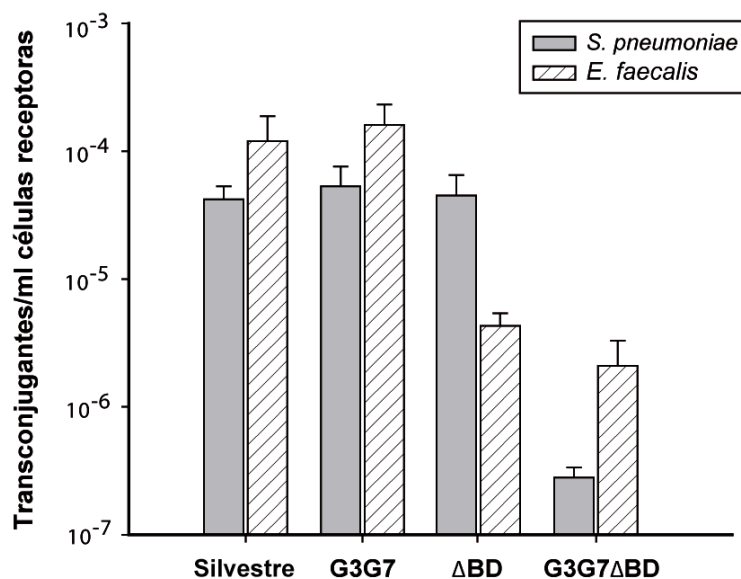


Figura 65. Frecuencias de movilización de pMV158 y derivados deficientes en los sso desde *S. pneumoniae* con pAMβ1 hacia un receptor de *S. pneumoniae* (barra gris) o de *E. faecalis* (barra rayada).

Las células transconjugantes fueron seleccionadas en medio AGCH con Tc (1 µg/ml), Nov (10 µg/ml) y 0.3% maltosa para *S. pneumoniae* MP3008 o en placas ESTY con Tc (4 µg/ml) y 0.3% glucosa para *E. faecalis* OG1RF. La frecuencia de conjugación se calculó como el número de transconjugantes por receptor, a una DO₆₅₀ de 5.5 × 10⁸ células/ml. Se indica la desviación estándar obtenida en el ensayo de conjugación en placas multipocillo (ver apartado 4.1 de este capítulo).

4.4. Medidas en la acumulación de ssDNA en la célula receptora

Los plásmidos que replican por el mecanismo RC y que tienen afectada la síntesis de la cadena retrasada (por ejemplo, por delección o por falta de funcionalidad del sso) presentan un fenotipo de disminución del número de copias y de aumento en la acumulación de intermediarios de ssDNA con respecto al plásmido silvestre (del Solar *et al.*, 1987b). Por ello, se decidió determinar el número de copias y la cantidad de intermediarios plasmídicos monocatenarios (ssDNA) en extractos celulares. Ello permitió evaluar la funcionalidad de los sso en las cepas que habían adquirido los diferentes plásmidos mutantes. Para ello, se seleccionaron tres colonias de cada uno de los transconjugantes y se crecieron en cultivos líquidos durante 30 generaciones. Tras una extracción de DNA total, las diferentes formas plasmídicas fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa con BrEt, transferidas a filtros de nylon y analizadas posteriormente mediante hibridación Southern con una sonda de dsDNA desnaturizado (Figs. 66 y 67). Cada una de las especies plasmídicas se cuantificó y, teniendo en cuenta la naturaleza de la sonda (marcada en las dos cadenas con ³²P), se multiplicó el valor obtenido para las especies ssDNA por un factor de 2. Para

facilitar la interpretación de los datos, se definió: i) el número medio de copias plasmídico por equivalente cromosómico como N_{av} , y ii) la relación ss/dsDNA entre los derivados plasmídicos y el plásmido pMV158 como el coeficiente de acumulación (CA).

Tabla 11. Número de copias plasmídico, ratios moleculares ss/ds DNA y coeficiente de acumulación (AC).

Plásmido	<i>S. pneumoniae</i> MP3008			<i>E. faecalis</i> OG1RF		
	N_{av} ^a	ss/ds DNA	CA ^b	N_{av} ^a	ss/ds DNA	CA ^b
pMV158	31±5	0.007±0.0003	1	17±4	0.007±0.001	1
pMV158G3G7	33±6	0.012±0.0006	1.8	14±3	0.014±0.002	2
pMV158ΔBD	32±4	0.009±0.0007	1.3	4±2	0.095±0.006	13.6
pMV158G3G7ΔBD	8±1	0.31±0.05	44.3	2±1	0.20±0.06	28.6

^aNúmero de copias plasmídico, medido como DNA de doble cadena por equivalente cromosómico.

^bRelación entre los ratios moleculares ss/dsDNA de los mutantes respecto al plásmido silvestre.

En *S. pneumoniae*, no hubo diferencias significativas entre el número de copias plasmídicas y la cantidad acumulada de ssDNA en los derivados deficientes en uno u otro sso (pMV158G3G7 y pMV158ΔBD) con respecto al plásmido silvestre (≈ 32 copias y $CA < 2$, respectivamente). Estos datos demostraron que, efectivamente, ambos sso son eficientes en la conversión post-conjugativa $ss \rightarrow dsDNA$ en *S. pneumoniae*, correlacionándose con las eficiencias de conjugación observadas. El mismo resultado se obtuvo al comparar el plásmido deficiente en *ssoA* con respecto a pMV158 en los transconjugantes de *E. faecalis* (≈ 15 copias, $CA = 2$). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en el caso del derivado defectivo en la función del *ssoU* (pMV158ΔBD) en los que el número de copias disminuyó a menos de la mitad (4 copias) y los intermediarios de ssDNA se acumularon en cantidades superiores a 10 veces (Tabla 11). Tanto en *S. pneumoniae* como en *E. faecalis*, los transconjugantes que habían adquirido el plásmido con mutaciones en los dos sso (pMV158G3G7ΔBD) mostraron una reducción notable de 3 a 4 veces en el valor N_{av} (de 30 a 8-10) y la relación ss/dsDNA aumentó de forma significativa, con un fuerte incremento del coeficiente CA, mayor de 40 (Figs. 68 y 69). Estos resultados indicaron que: i) en *S. pneumoniae* ambos sso son funcionales con la misma eficiencia y, por lo tanto, un origen puede reemplazar al otro; y ii) aunque el origen *ssoA* es parcialmente funcional en *E. faecalis*, solamente *ssoU* es el origen de cadena retrasada que actúa con alta

eficiencia en este huésped y sería el *sso* implicado en la replicación post-conjugativa de la cadena retrasada.

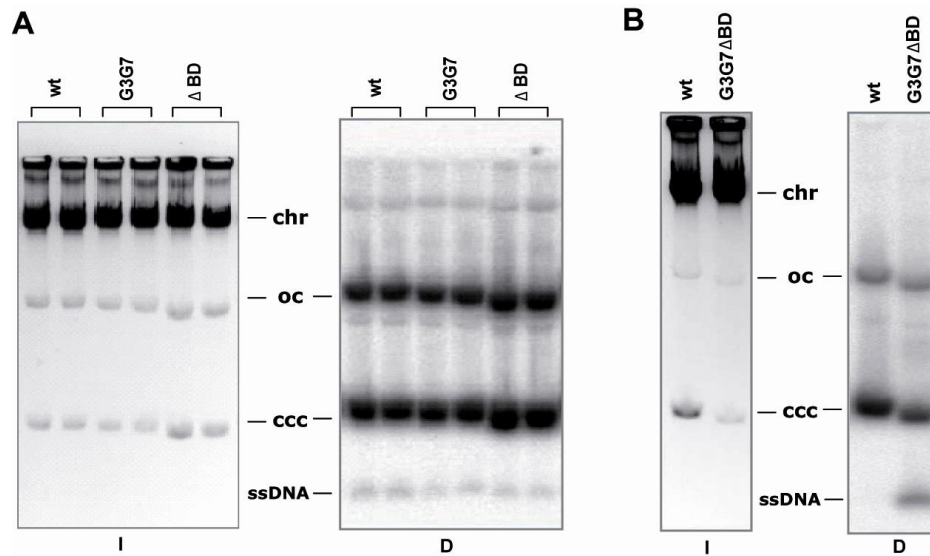


Figura 66. Acumulación de formas ssDNA de pMV158 y derivados con mutaciones en *ssoA* o en *ssuU* (A) o en ambos *sso* (B), en *S. pneumoniae*.

Se cargaron cantidades equivalentes de los extractos crudos celulares en geles de agarosa con 0.5 μg/ml BrEt (I, izquierda). Tras la desnaturalización con NaOH, el DNA se transfirió a membranas de nylon, se hibridó con sonda marcada (32 P) y se autorradiografió (D, derecha). Abreviaturas: chr, DNA cromosómico; oc, formas plasmídicas relajadas; ccc, formas superenrolladas; ssDNA, intermediarios plasmídicos de DNA monocatenario. Ver Tabla 11.

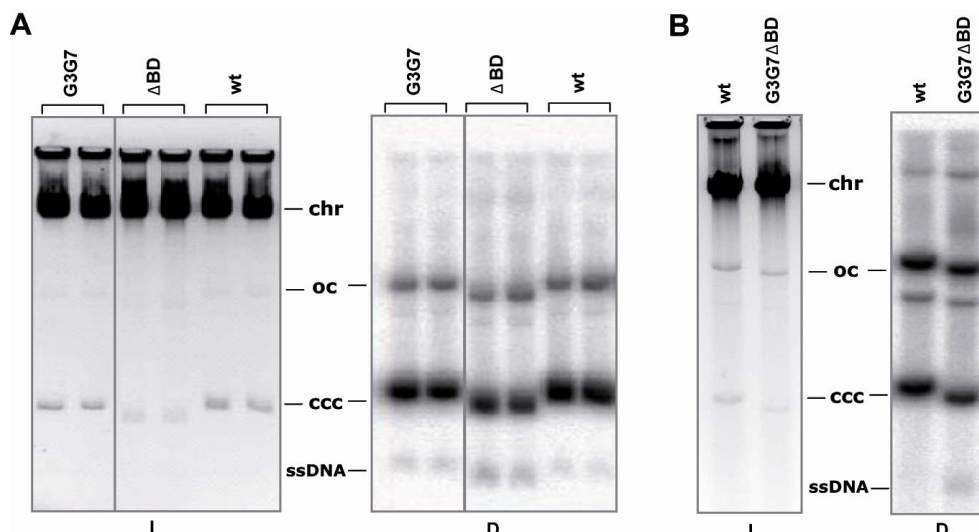


Figura 67. Acumulación de formas monocatenarias de pMV158 y derivados con mutaciones en *ssoA* o en *ssuU* (A) o en ambos *sso* (B), en *E. faecalis*.

Se cargaron equivalentes de los extractos crudos en geles de agarosa con 0.5 μg/ml BrEt (izquierda). El DNA total se preparó como se indica en la Figura 66. Ver Tabla 11.

DISCUSIÓN

¿Es MobM un regulador transcripcional?

Los mecanismos de regulación de la expresión génica durante la conjugación plasmídica son muy diversos. Como se comenta en la introducción, la inducción de la transferencia de los plásmidos Ti (*A. tumefaciens*) depende de un mecanismo complejo de tipo “Quorum-sensing” (Oger & Farrand, 2002). A su vez, el circuito regulador de los genes implicados en la transferencia de plásmidos tipo F está compuesto por más de 8 elementos diferentes (Gubbins *et al.*, 2003; Camacho *et al.*, 2005a; Camacho & Casadesús, 2005b; Will & Frost, 2006a; Will & Frost, 2006b). Existen varios estudios en sistemas menos complejos que demuestran la capacidad de la proteína iniciadora de la conjugación para regular su propia expresión y la de los genes que se encuentran en el mismo operón. Concretamente, el casete de transferencia del plásmido conjugativo pIP501 se compone de un operón de 15 genes, el primero de los cuales codifica la relaxasa TraA. La secuencia del *oriT* solapa parcialmente con el promotor y, aunque se encuentran en cadenas opuestas del DNA, la unión de la proteína TraA supone la regulación negativa del operón a nivel transcripcional (Kurenbach *et al.*, 2002). Otro ejemplo de autorregulación es la relaxasa Mob del plásmido movilizable pBBR1. Aquí, *oriT* y promotor se sitúan en la misma cadena del DNA y solapan hasta tal punto que el sitio de corte de Mob coincide con la caja -10 (Szpirer *et al.*, 2001). En pMV158, el promotor de *mobM* y el *oriT* están en la misma cadena. El análisis detallado de la configuración de la región promotora del gen *mobM* reveló que los promotores *Pmob1* (*L. lactis*) y *Pmob3* (*S. pneumoniae*) se localizan dentro de la secuencia del *oriT* de pMV158. Sin embargo, los resultados de transcripción *in vitro*, microscopía electrónica y extensión de cebador (*in vivo*) obtenidos en este trabajo (capítulo 1), demuestran que la RNAP *E. coli* se reconoce un promotor que solapa con el origen de transferencia (*Pmob2*), localizado a 3' de *Pmob1* y *Pmob3*. Esta distribución indicaría que la unión de MobM a su diana podría regular su propia expresión con mayor o menor intensidad dependiendo del contexto genómico en que se encuentre el plásmido pMV158. Como se demuestra en este trabajo, la interacción específica de la proteína MobM con el *oriT* de pMV158 depende de la conformación del DNA, mostrando baja o alta afinidad por un DNA bicatenario lineal o un DNA bicatenario superenrollado, respectivamente. Este hecho supuso un limitante a la hora de realizar estudios de interferencia mediante transcripción *in vitro* con la RNAP de *E. coli* en presencia de la proteína MobM, ya que para este ensayo se emplea un DNA lineal de doble cadena. Para obtener un sustrato compatible (DNA superenrollado) se planteará la construcción de fusiones transcripcionales entre el promotor de *mobM* y el gen *lacZ* empleando el vector pMP220 (Yanisch-Perron *et al.*,

1985), según se indica en la Figura 68A. Con el plásmido recombinante (pMP::oriT) se transformará una estirpe *E. coli* JM109(DE3), portadora de un vector compatible de expresión de MobM (pLGM2). En este escenario (Fig. 68B) se puede inducir la expresión de MobM de forma controlada desde pLGM2, mediante adición de IPTG en el cultivo. Si la unión de MobM al *oriT* clonado en pMP::oriT supone un impedimento para el reconocimiento del promotor *Pmob2* por parte de la RNAP de *E. coli*, la expresión del gen *lacZ* debería reprimirse en función a la concentración de IPTG añadido, y los niveles de β -galactosidasa disminuirían significativamente. De esta forma, podría medirse la actividad galactosidasa en presencia de X-gal en el medio de cultivo.

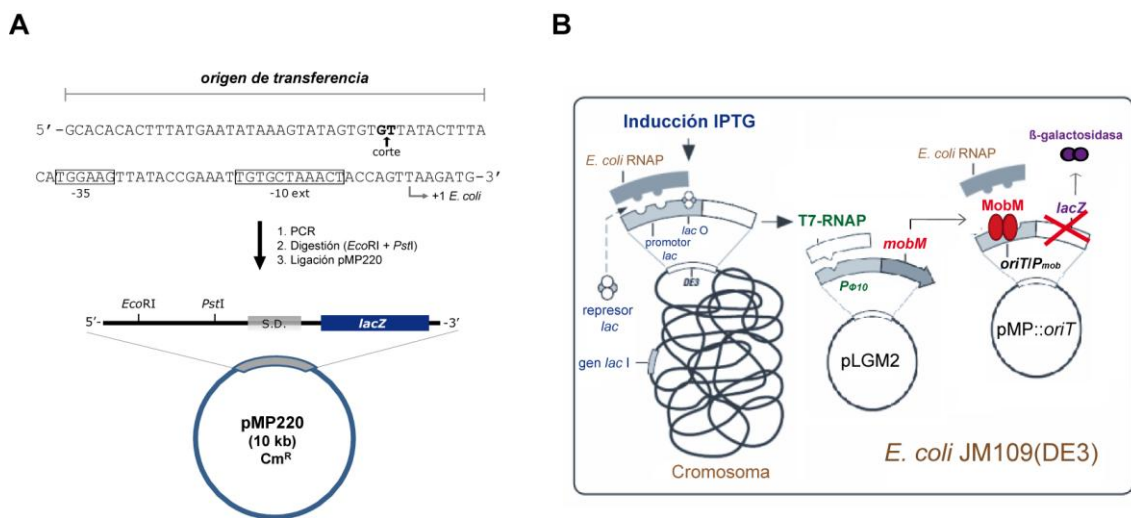


Figura 68. Análisis del circuito regulador de MobM en *E. coli*.

A) Estrategia de clonaje direccional para la fusión transcripcional de la región promotora de *mobM* con el gen *lacZ*, empleando el vector pMP220. **B)** Análisis de la autorregulación del gen *mobM* en la estirpe *E. coli* JM109(DE3). En presencia de IPTG, el represor *lac* se inactiva y se separa de la región operadora del promotor *lacUV5*. Se sintetiza T7-RNAP, la cual reconoce el promotor $\Phi 10$ del fago T7 y transcribe el gen *mobM* clonado en el vector pLGM2. La proteína MobM reconoce su secuencia diana (*oriT*) en el plásmido pMP::oriT. Este fenómeno impide que la RNAP de *E. coli* inicie la transcripción del gen *lacZ* (tachado en rojo) desde el promotor del gen *mobM* (P_{mob}), disminuyendo los niveles de β -galactosidasa. Dicha reducción se puede analizar mediante medidas colorimétricas en función a la cantidad de X-gal metabolizado.

El dominio relaxasa de MobM se conserva en los plásmidos transferibles de la familia de replicación de pMV158

MobM es la relaxasa prototipo de una familia compuesta por casi 100 miembros (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). Atendiendo a la secuencia de las proteínas iniciadoras de la replicación (en lugar de las de conjugación) se puede establecer una nueva clasificación de replicones plasmídicos. Empleando este criterio, y tomando como referencia a la proteína de replicación RepB de pMV158 (en lugar de MobM), hemos obtenido una familia compuesta por 47 plásmidos RC, 15 de los cuales (pMV158 incluido) contienen genes que codificarían proteínas con actividad relaxasa (Tabla 12; Espinosa, *en preparación*).

Tabla 12. Plásmidos movilizables de la familia de replicación de pMV158.

Plásmido ^a	Tamaño (pb)	Huésped	Mob (aa) ^b	Marcador ^c	Nº. acceso	Referencia
pMV158	5540	<i>Streptococcus agalactiae</i>	494	Tet(L)	X15669	(Burdett, 1980)
pA1	2820	<i>Lactobacillus plantarum</i>	103	críptico	Z11717	(Vujcic & Topisirovic, 1993)
pBM02	3854	<i>Lactococcus lactis</i>	304	críptico	NC_004930	(Sánchez & Mayo, 2003)
pE194	3728	<i>Staphylococcus aureus</i>	403	MLS	NC_005908	(Horinouchi & Weisblum, 1982)
pER13	4139	<i>Streptococcus thermophilus</i>	499	críptico	NC_002776	(Somkuti & Steinberg, 2007)
pLA106	2862	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	411	críptico	NC_004985	(Sano <i>et al.</i> , 1997)
pLB4	3547	<i>Lactobacillus plantarum</i>	361	críptico	M33531	(Bates & Gilbert, 1989)
pLS55	5031	<i>Lactobacillus sakei</i> Rits 9	439	Tet(L)	NC_010375	(Ammor <i>et al.</i> , 2008)
pMA67	5030	<i>Paenibacillus larvae</i>	435	Tet(L)	DQ367664	(Murray <i>et al.</i> , 2007)
pPB1	2899	<i>Lactobacillus plantarum</i>	355	críptico	AJ716330	(de las Rivas <i>et al.</i> , 2004)
pRW35	4962	<i>Streptococcus pyogenes</i>	500	Erm(T)	NC_010423	(Woodbury <i>et al.</i> , 2008)
pSB02	3582	<i>Streptococcus bovis</i>	527	críptico	AB021465	(Nakamura <i>et al.</i> , 2000)
pSMQ172	4230	<i>Streptococcus thermophilus</i>	499	críptico	AF295100	(Turgeon & Moineau, 2001)
pSSU1	4975	<i>Streptococcus suis</i>	499	críptico	NC_002140	(Takamatsu <i>et al.</i> , 2000)
pYSI8	4973	<i>Lactobacillus sakei</i>	403	críptico	EU185047	(Zhai <i>et al.</i> , 2009)

^aEn el plásmido pSB02 se anota una ORF de tipo Mob con sólo 144 residuos, justo al final de la secuencia publicada (coordenadas 3149-3582). Dado que es un plásmido de DNA circular, tras ampliar la secuencia de análisis desde la coordenada 1 hasta 1150 pudimos identificar una ORF mayor, de 527 residuos.

^bSe indica el tamaño de las proteínas Mob en número de residuos aminoacídicos.

^cTet(L) y Erm(T): resistencia a los antibióticos tetraciclina y eritromicina, respectivamente. MLS: resistencia a macrólidos, lincosamida y estreptogramina.

Debido a la naturaleza modular de los plásmidos RCR, *a priori* no cabría esperar un alto grado de conservación entre los módulos de movilización en estos 15 plásmidos de la familia RCR de pMV158. Sin embargo, tras alinear y comparar las secuencias correspondientes a las relaxasas de los 14 plásmidos con respecto a MobM se observó que todas eran del tipo MOB_V (Figs. 10 y 69). Concretamente, 12 pertenecían al grupo MOB_{V1}, 1 al grupo MOB_{V2} (pSB02), y otra correspondía a una versión truncada (Mob del plásmido pA1), con sólo 109 residuos aminoacídicos. En este último caso, se ha observado que no existe un promotor génico definido además de que no se detecta traducción mediante ensayos *in vitro* (Vujcic & Topisirovic, 1993). El resto de las relaxasas varían en tamaño (desde 304 a 527 residuos aminoacídicos), pero todas contienen una región N-terminal intacta con los motivos I, II (excepto pSB02) y III. Estos datos sugieren que los plásmidos movilizables que forman parte de la familia RCR de pMV158 comparten un ancestro común, siendo menos probable que haya habido evolución convergente.

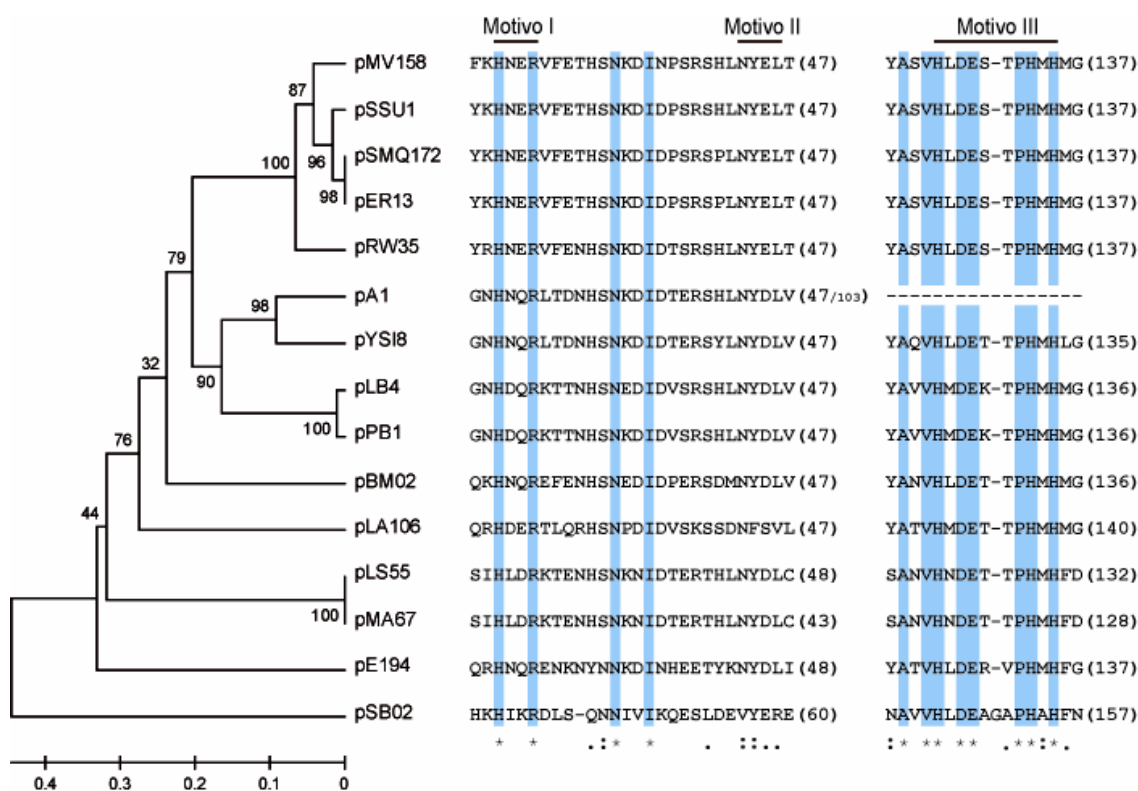


Figura 69. Árbol filogenético y alineamiento de la secuencia de la región amino-terminal de las proteínas de tipo MobM pertenecientes a la familia de plásmidos RCR de pMV158.

La escala situada debajo del árbol indica la distancia filogenética. En cada rama se muestra el valor de *bootstrap* obtenido (%) tras 1000 réplicas. El mayor o menor grado de conservación de secuencia en los motivos descritos (Francia *et al.*, 2004) se indica mediante un asterisco, un doble punto o un punto.

Propiedades y requerimientos estructurales del dominio relaxasa de la proteína MobM

Todos los motivos conservados, implicados tanto en el reconocimiento específico como en la actividad de corte y cierre de DNA que contiene el origen de transferencia, están localizados en la región N-terminal de las relaxasas, mientras que la región C-terminal suele contener dominios con actividad helicasa o primasa, además de dominios de oligomerización e interacción con otras proteínas (Grohmann *et al.*, 2003; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). En general, la integridad de todos estos dominios es esencial para que la transferencia conjugativa sea eficiente. Sin embargo, en casos concretos como en MobA de R1162 se ha demostrado que el dominio relaxasa sigue siendo funcional *in vivo* tras separarlo del dominio primasa (Becker & Meyer, 2002; Parker & Meyer, 2005a). Por otro lado, se ha demostrado que la actividad helicasa que presentan las relaxasas de los plásmidos de la familia MOB_F es esencial para la conjugación (Matson *et al.*, 2001; Csitkovits *et al.*, 2004). Las funciones que se han atribuido a la región C-terminal de MobM (494 residuos) son: i) dimerización a través de una cremallera de leucinas situada entre los residuos 317 y 338 (Grohmann *et al.*, 2003), y ii) asociación a la membrana plasmática, según se ha observado al interrumpir una región próxima al extremo C-terminal (a partir del residuo 400), rica en hélices- α , mediante la sustitución de ciertos residuos por prolina (de Antonio *et al.*, 2004). Además, los últimos 18 residuos del extremo C-terminal de MobM parecen ser esenciales para la transferencia, ya que la delección de una región cercana al final del gen *mobM* (comprendida entre los sitios de restricción *Afl*I y *Nco*I) dio lugar a un plásmido (pMV158 Δ NA) que no es movilizable (Lorenzo-Díaz & Espinosa, no publicado).

La mayoría de los estudios de caracterización de proteínas con actividad relaxasa se han realizado con versiones truncadas en las que se mantiene el dominio relaxasa pero se eliminan el resto de los dominios. En nuestro caso, para análisis tales como *footprinting* con DNA superenrollado o visualización de complejos por microscopía electrónica hemos podido trabajar con la versión nativa de MobM. No obstante, esta proteína presenta poca estabilidad (incluso en tampones con alta fuerza iónica) y bastante tendencia a la agregación, por lo que nos fue imposible llevar a cabo análisis EMSA o de co-cristalización con DNA. Por esta razón se decidió purificar una versión truncada de MobM. Los criterios para decidir la longitud de esta nueva versión fueron la conservación de secuencia y la presencia de los tres motivos descritos para

las proteínas de la familia MOB_V. Los alineamientos realizados entre la secuencias de MobM y las relaxasas de la familia solo exhibían un grado elevado de identidad en los primeros 200 aminoácidos, de ahí la construcción y purificación de la proteína MobMN199. Esta proteína, además de presentar mayor solubilidad y estabilidad que la versión silvestre, mantenía la actividad relaxasa sobre DNA superenrollado de pMV158 a pesar de ser un monómero. Sin embargo, esta versión no es capaz de cortar DNA monocatenario. La versión de la proteína MobMN243, con la que estamos trabajando actualmente, si presenta actividad de corte sobre oligonucleótidos. Este fenómeno se ha observado para la proteína TrwC pero en sentido contrario (Llosa *et al.*, 1996). Mientras que la versión TrwC-N275 cataliza la reacción de corte y transferencia de cadenas usando oligonucleótidos, el fragmento mínimo para relajar DNA superenrollado contiene 18 aminoácidos más (TrwC-N293). Los primeros 306 aminoácidos de la proteína TraI_F presentan actividad relaxasa sobre DNA superenrollado y de corte sobre oligonucleótidos (Byrd *et al.*, 2002), pero una versión más corta de aproximadamente 240 residuos (TraI26) pierde la capacidad de reconocimiento específico de DNA (Street *et al.*, 2003). En el caso de MobA (R1162) se ha determinado que un fragmento con 186 residuos desde el extremo N-terminal puede cortar tanto DNA monocatenario como superenrollado (Becker & Meyer, 2002; Monzingo *et al.*, 2007).

Tabla 13. **Actividad de MobM y sus derivados**

Proteína	Residuos ^a	Masa molecular ^b	Actividad sobre DNA	
			Superenrollado	Monocatenario
MobM	494	57869.4	Sí	Sí
MobMN243	243	28558.8	Sí	Sí
MobMN199	199	23261.0	Sí	No
MobMN199His	208	24455.2	No	No

^aNúmero de residuos aminoácidos totales, sin descontar la Met1, la cual es procesada en el sistema de expresión empleado en este trabajo.

^bEstimación en Daltons, incluyendo el residuo Met1.

En la Tabla 13 se resume la actividad relaxasa dependiendo del tipo de sustrato de DNA y de la longitud de los derivados de MobM (o la presencia de una cola His en el extremo C-terminal). Según nuestras predicciones estructurales, los 44 residuos extra que presenta la versión MobMN243 en el extremo C-terminal (respecto a MobMN199), formarían una serie de hélices- α que deberían introducir el extremo 3' de un DNA libre hacia el centro activo. La ausencia de esta región explicaría porque la

proteína MobMN199 no es capaz de procesar un sustrato monocatenario DNA. El hecho de que en DNA superenrollado bicatenario no hay extremos de DNA libre podría ser la razón de por qué MobMN199 si pueda procesar un sustrato de este tipo. El análisis comparativo entre la versión MobMN243 y MobMN199 es un claro ejemplo de la relación que existe entre la estructura y la función de esta proteína.

Los análisis de CD y de actividad relaxasa realizados con MobMN199 en presencia de diferentes cationes desvelaron que el metal preferido era Mn^{2+} . Las medidas de ITC mostraron una alta afinidad de MobMN199 por Mn^{2+} (concentraciones nanomolares), lo cual confirmaba esos datos. Además, dado que se estimó una estequiometría de unión 1:1 en las condiciones del ensayo empleadas, asumimos que el sitio de unión primario de Mn^{2+} está conformado por las His del motivo III (o HUH), en el centro activo de la proteína (Figs. 57 y 70). No obstante, aún no disponemos de información estructural que desvele la naturaleza del metal unido y cuál es su geometría de coordinación. En este sentido, un trabajo reciente con la proteína Tral_F ha demostrado que, aunque el papel de los residuos del motivo HUH es asimétrico, mutaciones individuales en cualquiera de sus tres His afecta significativamente a la unión del metal (Larkin *et al.*, 2007). Esta posible unión de Mn^{2+} en el centro activo de MobMN199 explicaría, en parte, que la estabilidad térmica de MobMN199 sea dependiente de la presencia de este catión. El efecto de los cationes como estabilizadores térmicos también se ha observado para el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* con iones Mg^{2+} (Richard *et al.*, 2006), y para un complejo receptor de luz (LH1-RC) de la bacteria termófila *Thermochromatium tepidum* con iones Ca^{2+} (Kimura *et al.*, 2009). Además, no hay que descartar que, aparte del sitio primario de unión, la unión de más iones en otras regiones de la proteína tenga un efecto protector. Así, los autores que han presentado la estructura cristalográfica del dominio relaxasa de MobA (denominado minMobA), afirman que hay tres sitios de unión de Mn^{2+} , con el sitio primario en el centro activo de la proteína, y otros dos iones Mn^{2+} que estarían coordinados por las parejas de residuos H46/Q97 y H98/E52, respectivamente (Monzingo *et al.*, 2007). Otro aspecto interesante fue que, aunque el Mg^{2+} era el único metal capaz de soportar una actividad relaxasa de MobMN199 al mismo nivel que con Mn^{2+} , no se observó una protección frente a la desnaturalización térmica con este catión. La presencia de Ca^{2+} pudo suplir parcialmente la actividad relaxasa, pero no Ba^{2+} o Zn^{2+} . En este sentido, y a diferencia de MobM, se ha observado que TrwC puede cortar DNA en presencia de una gran variedad de cationes, como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} o Co^{2+} (Boer *et al.*, 2006). Sin embargo,

TrwC requiere una concentración de Mg^{2+} o Ca^{2+} mucho mayor que de Zn^{2+} , Ni^{2+} o Cu^{2+} para mantener el mismo nivel de actividad. Además, mientras que no se observó Mn^{2+} o Mg^{2+} en los cristales de TrwC resueltos, la unión de Ni^{2+} , Zn^{2+} o Cu^{2+} provocó algunos cambios conformacionales en la estructura de la proteína (Boer *et al.*, 2006). Si este fuera el caso en MobMN199, ello podría explicar la falta de protección térmica por parte del Mg^{2+} . La única información disponible en cuanto a la utilización de metales por parte de las relaxasas de tipo MOB_V se encuentra en los sistemas Mob_pBBR1 (Szpirer *et al.*, 2001) y BmpH_Tn5520 (Vedantam *et al.*, 2006), ambos activos con Mg^{2+} . Por ello, sería interesante conocer si la preferencia de unión de metal podría reflejar una característica común de las relaxasas MOB_V o bien se trata de una adaptación a la sensibilidad del huésped del plásmido hacia los metales. Según publicaciones recientes (Waldron & Robinson, 2009a; Waldron *et al.*, 2009b), la disponibilidad de un metal para un microorganismo y la forma en que se regula su homeostasis es determinante para que las metaloproteasas capten el elemento adecuado. En este aspecto, el huésped empleado en la mayoría de los estudios realizados con el plásmido pMV158 es *S. pneumoniae*, en el que se ha detectado recientemente una proteína (MntE) implicada en el transporte de Mn^{2+} (Rosch *et al.*, 2009). Además, hay que destacar que la proteína RepB, iniciadora de la replicación de pMV158, requiere preferentemente Mn^{2+} para una actividad óptima de corte sobre DNA *in vitro* (de la Campa *et al.*, 1990). Este es el catión que se ha observado en el centro activo tras resolver la estructura tridimensional de RepB (Boer *et al.*, 2009).

Nuestros resultados han permitido demostrar que la proteína MobMN199 mantiene la capacidad de corte y cierre tras la desnaturalización térmica. Esta podría ser una característica importante para el proceso de transferencia plasmídica. Se ha demostrado que TrwC entra en la célula receptora durante la conjugación (Draper *et al.*, 2005), a pesar de ser una proteína dimérica relativamente grande, con 966 aminoácidos y un peso molecular estimado de 213.5 kDa (Llosa *et al.*, 1994a). Además, la transferencia del plásmido R388 se inhibe desde el receptor mediante expresión de anticuerpos que bloquean al residuo Y26 de TrwC, responsable del cierre del DNA (Garcillán-Barcia *et al.*, 2007; González-Pérez *et al.*, 2007). Si este fuera el caso para MobM, el cambio conformacional que tendría que sufrir para pasar a través del sistema de secreción podría revertir, manteniendo así la actividad de transferencia de cadenas en el receptor. No obstante, se ha demostrado que el dominio relaxasa TrwC-N275 tiene un centro de hélices- α resistente a la temperatura, pero que una desnaturalización térmica lenta supone cambios irreversibles en la parte exterior de la proteína, compuesta por lámina- β y estructuras desordenadas (Arrondo *et al.*, 2003).

¿Cuál es el residuo catalítico en las relaxasas de la familia MOB_V?

Las relaxasas pueden clasificarse en dos grupos dependiendo del número de tirosinas catalíticas (Fig. 10; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). Salvo los plásmidos de la familia MOB_F, cuyas relaxasas tienen dos Tyr activas (representada por TrwC), el resto de las familias solo presentan una Tyr en el centro activo. Recientemente se ha demostrado que la relaxasa TrwC presenta un mecanismo secuencial en el que la Y18 corta el DNA para iniciar el proceso, mientras que Y26 lleva a cabo la reacción de cierre en la terminación de la transferencia (González-Pérez *et al.*, 2007). Las relaxasas con una sola Tyr catalítica suelen conformar unidades funcionales diméricas de manera que las Ys de los respectivos monómeros estarían implicadas en el inicio y la terminación del proceso conjugativo, tal y como se ha demostrado para la proteína Tral del plásmido RP4 (Pansegrau & Lanka, 1996a). Este podría ser el caso de la proteína MobM ya que según se ha observado mediante ultracentrifugación analítica es un dímero en solución (de Antonio *et al.*, 2004). El residuo catalítico que se había propuesto para MobM es la Tyr44, localizada en el motivo II (Fig. 69; Grohmann *et al.*, 1999). Sin embargo, este residuo solo se conserva en un subgrupo de la familia MOB_V representado por el plásmido pMV158 (Francia *et al.*, 2004). En el trabajo presentado en esta tesis se demuestra claramente que Tyr 44 no es el residuo catalítico, ya que un mutante Y44F de MobM mantiene la actividad de corte sobre DNA superenrollado (Fig. 58). Además, según los datos estructurales, el residuo Y44 se encuentra alejado del centro activo de la proteína (Fig. 57). La ausencia del motivo II en el otro grupo principal de la familia MOB_V, representado por el plásmido pBBR1, está en concordancia con estos resultados. Por su proximidad al centro activo y la similitud en la ubicación con respecto a la Y18 de la proteína TrwC (implicada en el primer corte del DNA), el siguiente candidato a analizar en la proteína MobM ha sido el residuo Y122 (Fig. 70). Concretamente, los intentos de obtener un mutante Y122F de MobMN199 han sido fallidos debido a que esta proteína mutante no se une a la matriz de heparina-agarosa durante la etapa de purificación de la proteína. Aunque en un futuro cercano se intentará optimizar un protocolo diferente del que disponemos, el hecho de que el mutante Y122F no presente afinidad por heparina podría ser un indicativo de que ese residuo esté implicado en el reconocimiento específico y/o procesamiento del DNA. No obstante, en un trabajo previo en el que se han mutagenizado las 7 tirosinas de la proteína Mob de pBBR1, no se ha observado disminución alguna en la capacidad de transferencia (Szpirer *et al.*, 2001). Además, se

ha demostrado que los residuos D120 y E121 de la proteína Mob_pBBR1 (ambos del motivo 3-H) fueron esenciales para la movilización de pBBR1, sugiriendo que podrían formar parte del centro activo para coordinar un átomo de Mg^{2+} o bien para cortar el enlace fosfodiéster del DNA. Por otro lado, H22 es uno de los residuos del motivo I (Fig. 69), el cual es exclusivo y presenta un alto grado de conservación dentro de la familia MOB_V (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). Aunque hasta ahora no se ha atribuido ninguna función a este motivo, hemos obtenido resultados preliminares en nuestro laboratorio con un mutante H22A de la proteína MobMN199 que indican que este residuo es esencial para el corte de DNA superenrollado. Debido a que MobMN199 no es capaz de procesar DNA monocatenario (Tabla 13), aún se necesitan nuevos ensayos de actividad con un mutante H22A sobre la versión MobMN243. Estos resultados dejan abierta la cuestión de cuál de los residuos está implicado directamente en el ataque nucleofílico del DNA en la familia MOB_V .

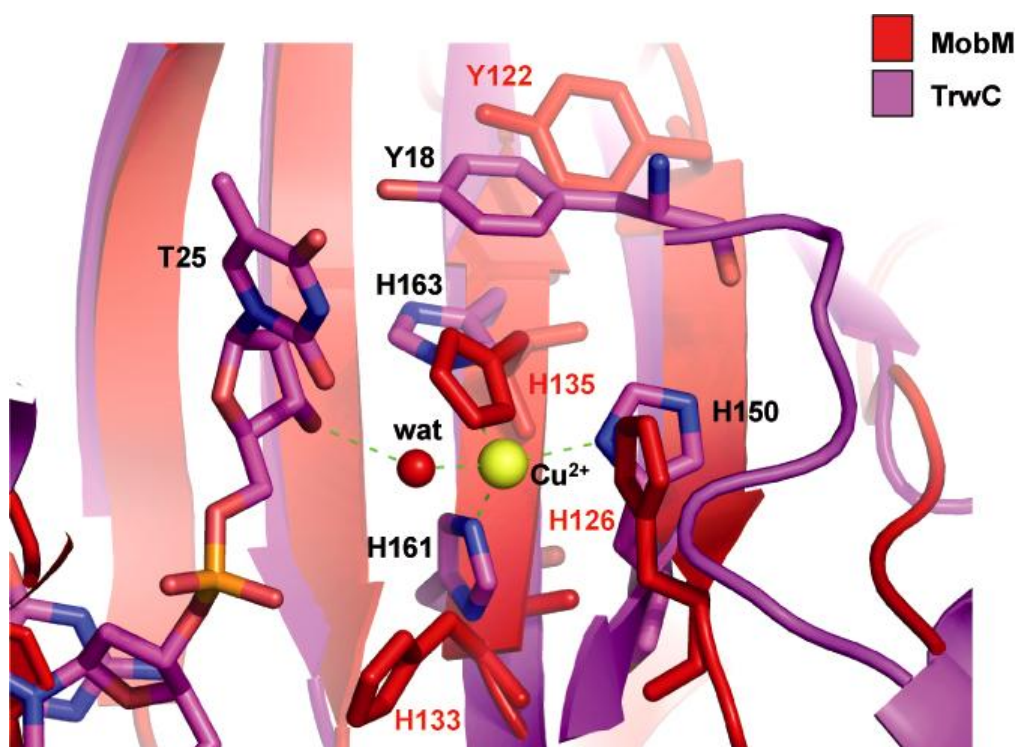


Figura 70. Superposición de los centros activos de las relaxasas MobM-26DNA y TrwC-25DNA- Ni^{2+} .

Cedido por Russi, 2009.

Hasta la fecha solamente se han publicado tres estructuras tridimensionales de dominios relaxasa de proteínas que pertenecen a las familias MOB_F (TrwC_R388 y TraI_F) y MOB_Q (MobA_R1162). A pesar de la baja identidad de secuencia que hay entre las relaxasas de ambas familias, existe una gran correlación estructural (Guasch

et al., 2003; Datta *et al.*, 2003; Monzingo *et al.*, 2007). De forma genérica, los centros activos de estas proteínas se componen de: i) una o dos Tyr catalíticas; ii) una triada de His (motivo 3H) implicada en la coordinación de un metal divalente esencial en el posicionamiento del DNA; iii) una base general, normalmente Asp (D85 en TrwC) o Glu (ζ E38 o E74 en MobA?), que por un lado potencia el ataque nucleofílico de la Tyr catalítica (por sustracción del protón del grupo hidroxilo), y por otro es capaz de modular la coordinación del metal divalente mediante interacción con una de las His del motivo “HUH”; y iv) un ácido general, probablemente His o Arg (H163 o R154 en TrwC), que aportaría un protón al átomo O3' del nucleótido que queda libre tras el corte, además de posicionar el DNA de forma conjunta con el metal. Con esta información nos atrevemos a proponer que, para MobM, Y122, H22 y E82 actuarían como residuo catalítico, residuo ácido y residuo básico, respectivamente dentro del centro activo de la proteína. Además, las histidinas H126, H133 y H135 (motivo 3-H) coordinarían un átomo de Mn^{2+} (Fig. 70).

Las interacciones de la proteína MobM con el *oriT* dependen de la secuencia y topología del DNA

Según el presente modelo de conjugación, la topología del DNA en el inicio debería ser totalmente diferente que en la terminación de la transferencia plasmídica (Fig. 21). En el inicio del proceso conjugativo de pMV158, MobM debe reconocer DNA bicatenario superenrollado. En un trabajo previo de *footprinting* con DNasa I en el que se empleó un DNA bicatenario lineal con la secuencia del *oriT*, se observó que la proteína MobM protegía dos regiones que correspondían al brazo izquierdo y derecho del IR2, mientras que la región del IR1 y del sitio de corte se mantenían desprotegidas (Fig. 18; Grohmann *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta que en el inicio de la transferencia la conformación del DNA plasmídico es bicatenario y superenrollado, hemos querido analizar cual(es) de las repeticiones invertidas del *oriT* de pMV158 tenían un papel importante en la interacción con MobM en este tipo de sustrato. En las hipótesis originales se propuso que las estructuras tipo tallo-lazo formadas en el *oriT* por las repeticiones invertidas IR2 e IR3 podrían ser, respectivamente, las conformaciones adoptadas en el inicio y terminación del proceso. Sin embargo, los resultados de *footprinting* obtenidos en este trabajo permiten deducir que la conformación del *oriT* en el DNA superenrollado de pMV158 adopta una estructura de

tipo IR3. Según el modelo que proponemos en la Figura 72, la unión de MobM a dicha estructura desencadenaría una serie de cambios estructurales importantes, entre los cuales destaca la apertura de la base del tallo de IR3 (60% de contenido en GC) y, consecuentemente, la fusión del DNA en la región del *oriT* que contiene el sitio de corte. De esta manera, el desplazamiento de IR3 hacia una estructura de tipo IR1 generaría un sustrato de cadena sencilla, adecuado para la entrada en el centro activo de la proteína y corte en el sitio *nic*.

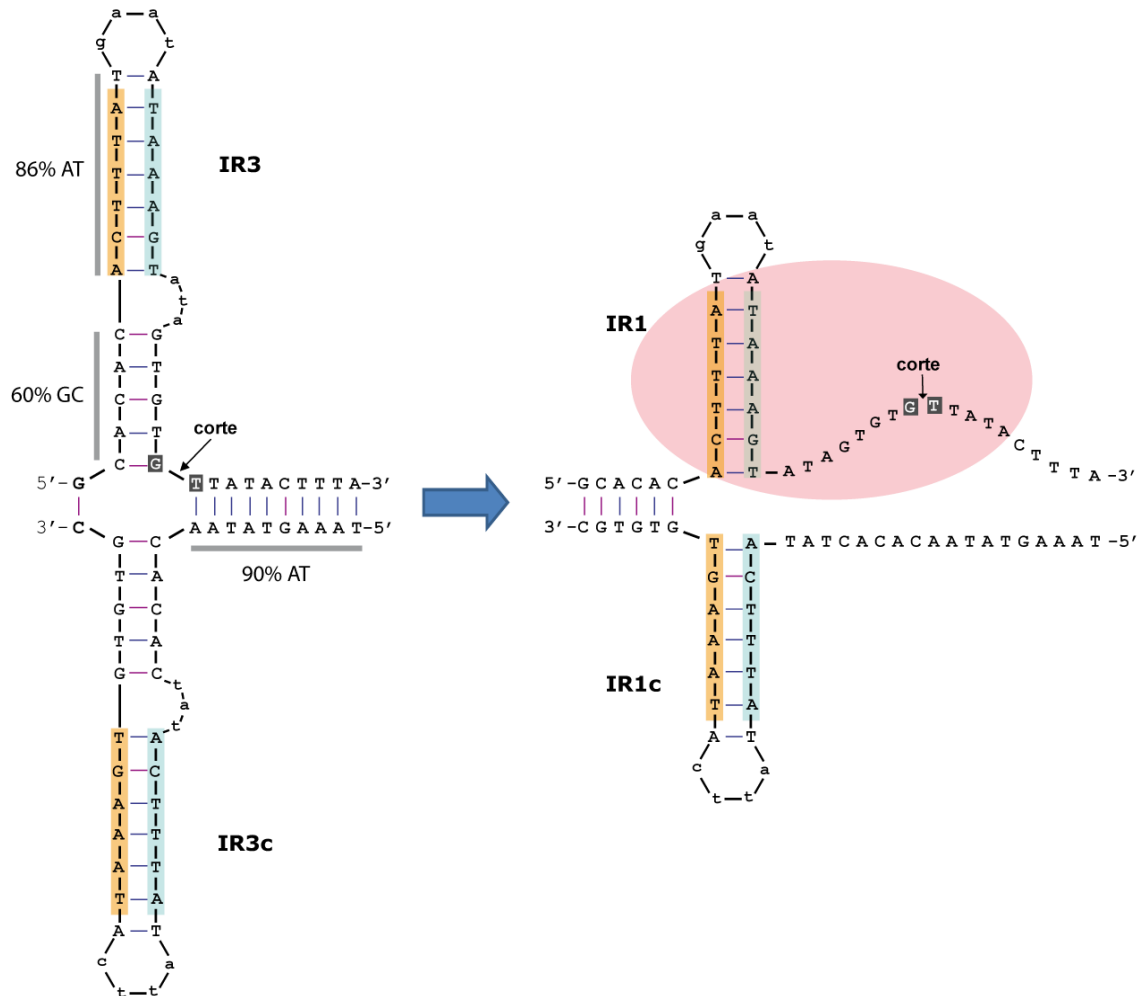


Figura 72. Modelo de interacción proteína-DNA en el inicio de la transferencia.

La estructura cruciforme de tipo IR3 preformada en el DNA superenrollado de pMV158 (izquierda) sufre un cambio conformacional inducido tras la unión de MobM (elipse), hacia una estructura de tipo IR1 en la que la región que incluye el sitio de corte pasa a un estado monocatenario (derecha).

En cuanto a la terminación por cierre de la cadena transferente en la célula receptora, la estructura más estable en la forma monocatenaria (ssDNA) de pMV158 sería la de una horquilla de tipo IR3, a pesar de que existiera replicación conjugativa en el donador (y se reconstituyera el brazo derecho de IR2), aunque aún no hay datos

experimentales que despejen esta incógnita. En este sentido, durante el desarrollo de esta tesis se realizaron varios ensayos de replicación iniciada por MobM en extractos S30 de *E. coli*, aunque los resultados obtenidos fueron negativos. Esto podría indicar que en el caso de la transferencia de pMV158 no hay replicación en el donador, y que la copia que se pierde en este proceso se recuperaría rápidamente mediante replicación vegetativa, tal y como se ha propuesto para el plásmido RSF1010 (Meyer, 2009). La pregunta que se plantea ante estos resultados es cuál es el papel de IR2. A pesar de que esta secuencia se conserva en los plásmidos de la familia de pMV158, no es reconocida por MobM en forma monocatenaria (Fig. 49) y, según los análisis de *footprinting* con DNA superenrollado, no parece extruirse. Aunque será necesario un estudio exhaustivo mediante la construcción de mutantes en esta región del *oriT*, cabe destacar que la secuencia del brazo derecho de IR2 (5'-TTATACTTTA-3') contiene un 90% en contenido AT, lo cual favorecería la separación del DNA en esa región según el modelo que aquí se propone (Fig. 72).

En el caso del plásmido R100 se ha observado mediante *footprinting* con KMnO_4 , que la unión de la relaxasa Tral a la región *nic* separa la doble cadena y genera una región de DNA de cadena sencilla (Fukuda & Ohtsubo, 1997). Así, la unión de Tral aumenta la sensibilidad a KMnO_4 en el sitio de corte, aunque en menor medida en las Ts de la cadena transferente, probablemente debido a una cierta protección por contactos específicos entre esa región del DNA y algunos residuos de la proteína. Sin embargo, en ausencia de Tral solo se funde el sitio adyacente de unión de la proteína accesoria TraY (el cual es rico en AT), pero no la región del sitio de corte. A su vez, en ese trabajo se demuestra que la eficiencia de corte de Tral sobre un DNA plasmídico solo se ve afectada cuando se introducen mutaciones en el brazo proximal del IR. En el caso de R388 también se ha observado un aumento en la oxidación del sitio de corte en presencia de la relaxasa TrwC, aunque no parece que el IR₂ que está a 5' de la región de corte esté extruido en el DNA (Guasch *et al.*, 2003). Mediante el uso de oligonucleótidos "suicidas" (en los que el sitio de corte está modificado) y mutantes en las dos Tyr activas de TrwC (Y18 e Y26), se ha demostrado que la formación de la horquilla IR₂ favorece a la reacción de religación del DNA por parte de Y26, esencial durante el proceso de terminación de la transferencia plasmídica (González-Pérez *et al.*, 2007). Otros trabajos realizados con los plásmidos R1162 (Bhattacharjee *et al.*, 1992; Becker & Meyer, 2000) y R64 (Furuya & Komano, 2000) demuestran que solo el brazo proximal de un IR localizado a 5' del sitio de corte es importante para el inicio de la transferencia, pero que es necesario el IR entero para la terminación. Teniendo en cuenta esta información, parece que en todos estos sistemas la relaxasa reconoce la

doble cadena del brazo proximal del DNA superenrollado para iniciar el proceso conjugativo, y que la extrusión de la horquilla solo afecta a la reacción de terminación, por lo que la región distal del IR es esencial en un sustrato monocatenario (Fig. 73).

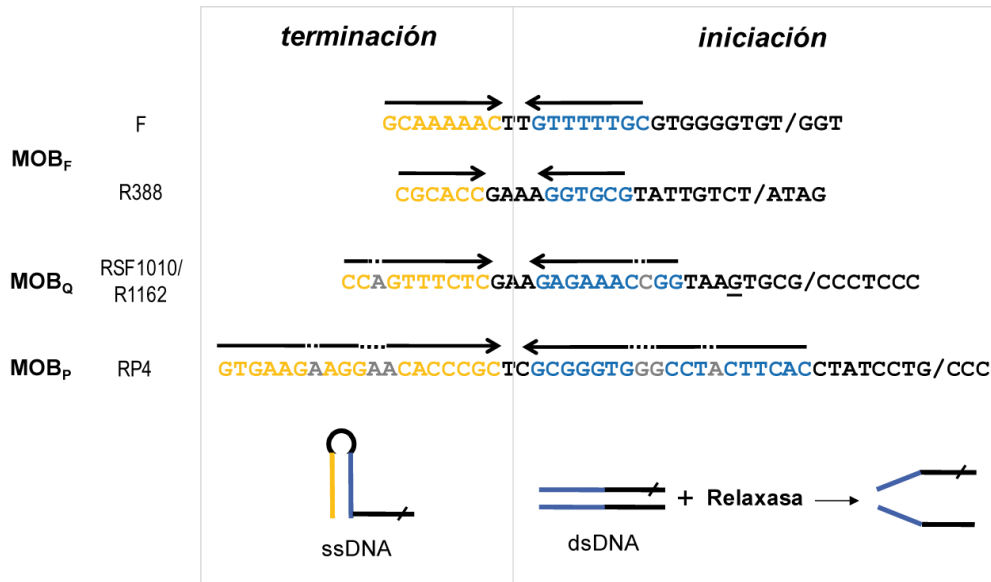


Figura 73. Funcionalidad del *oriT* en el inicio y la terminación de la transferencia conjugativa.

Se indica la secuencia de los *oriT*s de diferentes plásmidos de las familias MOB_F, MOB_Q y MOB_P, destacando la posición del brazo distal (amarillo) y proximal (azul) de la repetición invertida (flechas) a 5' del sitio de corte (""). En el inicio, la relaxasa reconoce el brazo proximal y separa la región del DNA que incluye el sitio de corte. En la terminación, el brazo distal juega un papel esencial para formar una horquilla que favorece el cierre del DNA por transferencia de cadenas.

Hay que tener en cuenta que los *oriT*s de estos plásmidos son muy distintos respecto al de pMV158, en el sentido de que solo presentan una repetición invertida alejada entre 8 y 9 pb a 5' del sitio de corte (Fig. 13). El *oriT* de pMV158 presenta tres IRs en una región muy compacta de 41 pb (Fig. 74A), de los cuales IR1 e IR3 parecen estar en un equilibrio dinámico de formación en DNA superenrollado, según los datos de *footprinting*. Los *oriT*s de los otros dos sistemas de la familia MOB_V estudiados con cierto detalle (pBBR1 y Tn5520) también presentan IRs en los que el sitio de corte se localizaría justo en la base de la horquilla (Szipirer *et al.*, 2001; Vedantam *et al.*, 2006). Sería interesante obtener mutantes de pMV158 en los que elimine la región del brazo izquierdo del IR3. Si nuestro modelo es válido, esperaríamos que la extrusión de una horquilla tipo IR3 en ese mutante no fuera posible y la eficiencia de corte *in vitro*, o de transferencia *in vivo* relativas al plásmido silvestre se vieran reducidas. Los complejos débiles observados en ensayos de EMSA con MobM y un fragmento de PCR que contiene la región del *oriT* (Fig. 40A) apoyan la idea de que MobM reconoce una

estructura secundaria preformada en el DNA superenrollado que, obviamente, está ausente en un DNA lineal bicatenario. En este sentido, se ha analizado la capacidad de unión de la relaxasa BmpH (perteneciente a la familia MOB_V) a un fragmento de DNA bicatenario de 520 pb que contenía el *oriT* de Tn5520 (Vedantam *et al.*, 2006). Aunque los autores afirman que la interacción es específica, hay que destacar que las concentraciones de proteína utilizadas en los ensayos EMSA eran muy elevadas (7.2 μ M, respecto a 60 pg de DNA). Más aún, la región mínima del *oriT* definido para Tn5520 incluye una IR de 17 pb que, en caso de extraírse, presentaría el sitio de corte en una región equivalente al de pMV158 (Fig. 72), en la base de la horquilla (Vedantam *et al.*, 2006). Probablemente, y a la luz de los resultados presentados en esta tesis, sería necesario mucha menos cantidad de proteína para observar una interacción específica entre BmpH con un DNA que incluyera el *oriT* mínimo en estado monocatenario.

En la definición de la secuencia mínima del *oriT* se observó que MobM reconoce un oligonucleótido con la secuencia de IR1 más ocho nucleótidos hasta el sitio de corte (IR1+8). La estructura del complejo MobMN199 se ha resuelto empleando este oligonucleótido, observando un monómero de proteína por molécula de DNA. La información publicada sugiere que las conformaciones observadas en las estructuras tridimensionales de TrwC corresponden al complejo formado por la relaxasa y el DNA durante la terminación de la transferencia conjugativa (Guasch *et al.*, 2003; González-Pérez *et al.*, 2007). Sin embargo, en el caso de pMV158, la estructura observada podría ser la conformación que tiene lugar en el inicio, según el modelo propuesto (Fig. 72). La relación observada entre los datos de *footprinting* con DNA superenrollado (resumidos en Fig. 74A) y la estructura tridimensional de MobMN199 con el oligonucleótido IR1+8 son concluyentes en este sentido. Según se ilustra en la Figura 74B, la zona de contacto entre la proteína y la doble hélice formada por el DNA de IR1 deja expuesta la región correspondiente al bucle de la horquilla (óvalo verde). Precisamente, dentro de esa región se observó un aumento en la digestión por DNasa I de las bases T11 y A12 (según las coordenadas de IR1+8), sobre el DNA superenrollado de pMV158 en presencia de MobM. A su vez, se observó una oxidación significativa de estas mismas bases (T11 y A12) por KMnO₄, aunque con menor grado que en ausencia de proteína MobM (ver Fig. 46 para más detalles). Por otro lado, puede observarse como todas las guaninas de IR1+8 (G17, G22, G24 y G26) contactadas por varios residuos de la proteína (ver Fig. 56) están protegidas frente a metilación por DMS. La única guanina en la que no se observó un efecto de

unión de MobM frente a DMS (G8) se localiza, precisamente, en la región desprotegida del bucle formado por IR1 (Fig. 74B, óvalo verde). Hay que destacar que el extremo 3' del DNA observado en la estructura no entra en el centro activo y las interacciones específicas que realmente se establecen en esa zona podrían variar. La resolución de la estructura de MobMN243 con IR1+8 por cristalografía de rayos X desvelará nuevos datos en este aspecto.

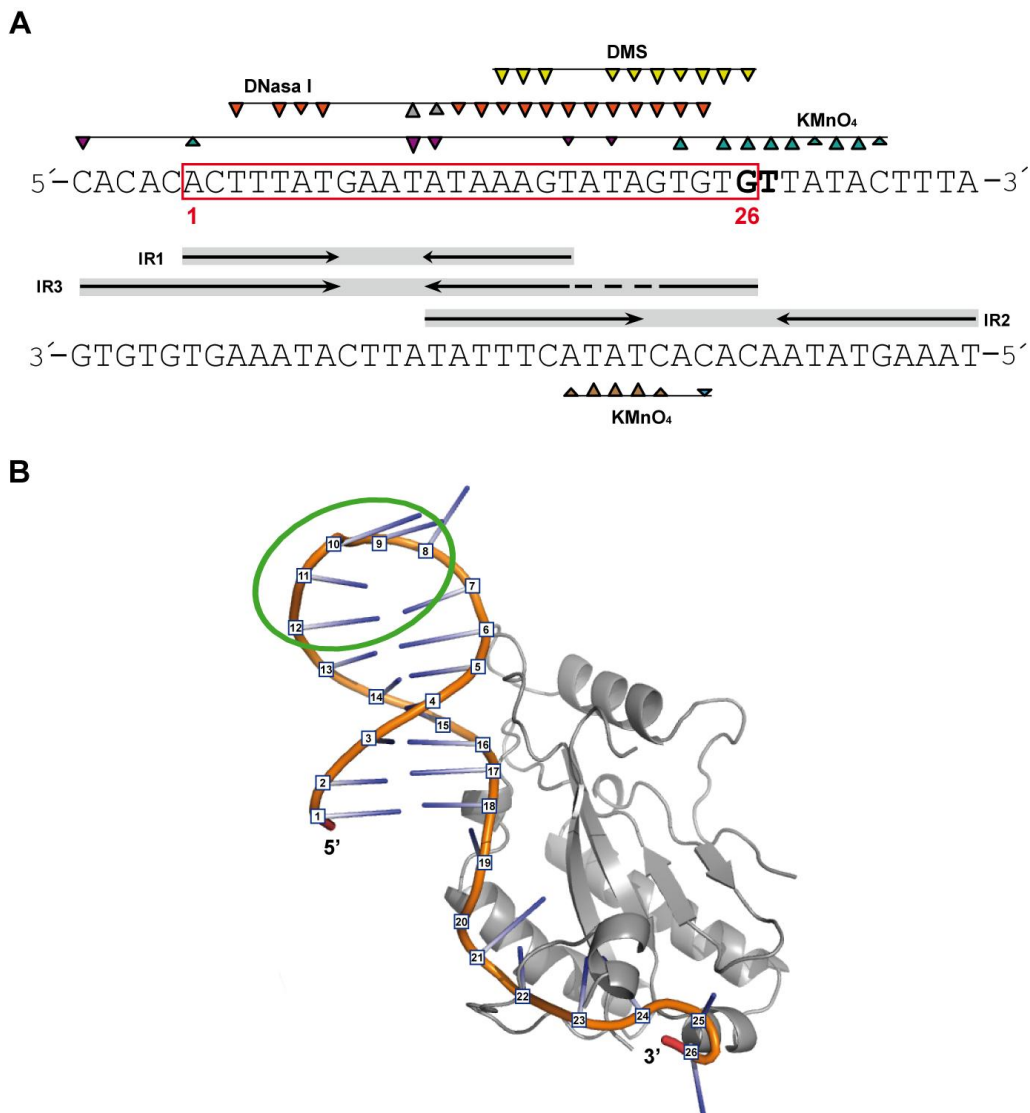


Figura 74. Correlación entre la estructura tridimensional y los datos de *footprinting* sobre DNA superenrollado.

A) Resumen de las bases modificadas en la cadena transferente o no-transferente del *oriT* de pMV158 mediante *footprinting* con DNasa I, DMS o KMnO_4 , en presencia de la proteína MobM. Los triángulos normales y los triángulos invertidos indican hiperexposición o protección frente al agente modificador, respectivamente. El dinucleótido de corte 5'-GpT-3' se indica en negrita y la secuencia correspondiente al oligonucleótido IR1+8 se delimita con un recuadro rojo. **B)** Estructura del complejo formado por MobMN199 (en gris) y el oligonucleótido IR1+8, indicando la localización de las bases del DNA y la región más expuesta a modificación (óvalo verde) frente a los diferentes agentes empleados en los análisis de *footprinting*.

La funcionalidad total del sso es esencial en el proceso conjugativo

En este trabajo se analiza por primera vez el papel de los orígenes de replicación de cadena retrasada de un plásmido RC, en la transferencia plasmídica horizontal. Desde nuestro punto de vista, para que el proceso conjugativo tenga éxito no solo es necesario que la molécula transferente de pMV158 entre en la célula receptora, también implica un establecimiento adecuado en el nuevo huésped. En este sentido, después de la recircularización del DNA deben existir mecanismos de conversión de la molécula ssDNA hacia DNA de doble cadena. Es aquí donde nos preguntábamos si los orígenes de replicación de cadena retrasada podrían actuar en la replicación conjugativa en el receptor. En este sentido, el plásmido pMV158 presenta un modelo ideal debido a que, precisamente, tiene dos *sso*: *ssoU* y *ssoA*. Anteriormente se había observado que el origen de tipo *ssoA* solo funciona eficientemente en el huésped nativo del plásmido, por lo que se postulaba que debían existir factores adicionales específicos que fueran los responsables de su mal funcionamiento en un huésped heterólogo (del Solar *et al.*, 1987b). No obstante, mientras que el *ssoA* de pMV158 no era funcional en *S. aureus*, se observó que soportaba la síntesis de cadena retrasada *in vitro*, con extractos celulares de estafilococo. Ello apuntaba a que el problema en la funcionalidad del *ssoA* radica en la eficiencia, y no en la falta de especificidad para iniciar el proceso replicativo (Kramer *et al.*, 1998a; Kramer *et al.*, 1998b). Así, la interacción eficiente entre el *ssoA* y la RNAP bacteriana podría ser el determinante del estrecho rango de funcionalidad en este tipo de origen de replicación. Teniendo en cuenta la estructura genética de pMV158 y su carácter promiscuo se ha llegado a proponer que el origen *ssoU* sería uno de los determinantes en el rango de huésped de plásmidos de tipo RC (del Solar *et al.*, 1996). Para profundizar en este asunto, se construyeron derivados de pMV158 que carecían de uno o ambos orígenes *sso*, y se llevaron a cabo una serie de estudios funcionales. El análisis de transferencia plasmídica de pMV158 y estos derivados *sso*-deficientes requería una aproximación rápida y reproducible. Es importante destacar que en muchos casos, las frecuencias de transferencia suelen estar entre 10^{-3} y 10^{-6} transconjugantes por receptor, lo cual indica que por cada 10^3 - 10^6 células receptoras solo una de ellas recibe el plásmido. La observación de niveles detectables de movilización del plásmido pMV158 entre células de *S. pneumoniae* en medio líquido es prácticamente nula, y solo es posible cuando se usan soportes sólidos (Smith *et al.*, 1980; Priebe & Lacks, 1989; Farías & Espinosa, 2000). En trabajos previos se habían

publicado métodos de análisis múltiple para el estudio del impacto de las condiciones ambientales (Johnsen & Kroer, 2007) o para la detección de inhibidores (Fernández-López *et al.*, 2005) sobre la conjugación plasmídica. Desafortunadamente, no se pudo aplicar ninguno de estos sistemas en nuestro estudio porque en ellos se empleaba un soporte líquidos o semi-sólido (agar), respectivamente. Por esta razón se diseñó y se puso a punto un nuevo protocolo de conjugación en filtro con placas multipocillo (Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009a). Esta aproximación nos permitió estudiar la movilización conjugativa intra- e inter-específica de pMV158 y sus derivados sso-deficientes en un mismo ensayo. Según se había optimizado previamente en nuestro laboratorio, los experimentos de transferencia plasmídica inter-específica se desarrollaron con estirpes de *S. pneumoniae* y *E. faecalis* como donadores o receptores, respectivamente (Nieto & Espinosa, 2003). Esto supuso una ventaja a la hora de seleccionar las células transconjugantes ya que los donadores *S. pneumoniae* no crecían en superficie por su naturaleza microaerófila. Los resultados obtenidos demostraron que ambos orígenes de cadena retrasada son funcionales al mismo nivel en *S. pneumoniae*. Por el contrario, el origen *ssoA* no es óptimo para la replicación de pMV158 en *E. faecalis* y, debido a ello, las tasas de conjugación desde neumococos a enterococos disminuyen dos órdenes de magnitud cuando el origen *ssoU* no es funcional. Según trabajos previos (Kramer *et al.*, 1999), y a la luz de los resultados obtenidos en esta tesis (Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009b), parece ser que la habilidad de *ssoU* para interactuar con la RNAP de varias especies bacterianas permiten a los plásmidos un amplio rango de huésped, contribuyendo así a la diseminación horizontal de los mismos.

El módulo MOB de pMV158, compuesto por el *oriT* y el gen *mobM* (ver Fig. 14), permanece inalterado en los derivados construidos con deficiencias en los sso. En este aspecto, si la transferencia es independiente de las copias plasmídicas en el donador, cabría esperar que el número de eventos de movilización desde una célula hacia otra fuera similar, independientemente de la actividad de los sso. Las moléculas transferidas (en forma de DNA monocatenario) que carezcan de un sso funcional no podrían reconstituirse a su forma bicatenaria de una manera eficiente. Dado que la distribución celular de las moléculas de un plásmido tipo RC es al azar (del Solar *et al.*, 1998), esto supone un punto crítico en el establecimiento del plásmido debido a su bajo número de copias en el momento de la división plasmídica. Concretamente, los plásmidos pMV158 y pMV158 Δ BD (deficiente en *ssoU*) tienen el mismo n^o de copias en *S. pneumoniae* y la misma capacidad de transferirse en función a los resultados de conjugación intra-específica obtenidos (Fig. 65). No obstante, la transferencia de

pMV158 Δ BD hacia *E. faecalis* fue significativamente menor respecto al plásmido silvestre y a pMV158G3G7 (deficiente en *ssoA*), demostrando la esencialidad del origen *ssoU* para una transferencia exitosa. Si la transferencia de pMV158 fuera independiente de la eficiencia de los *sso*, se esperaría las mismas frecuencias de conjugación con o sin defectos en estos elementos. La replicación conjugativa tendría lugar eficientemente, pero la replicación se vería afectada y/o ralentizada. Sin embargo, experimentalmente no se observaron incrementos en el número de transconjugantes tras periodos más largos de incubación de las placas, lo cual reflejó un efecto directo de los *sso* en la transferencia plasmídica.

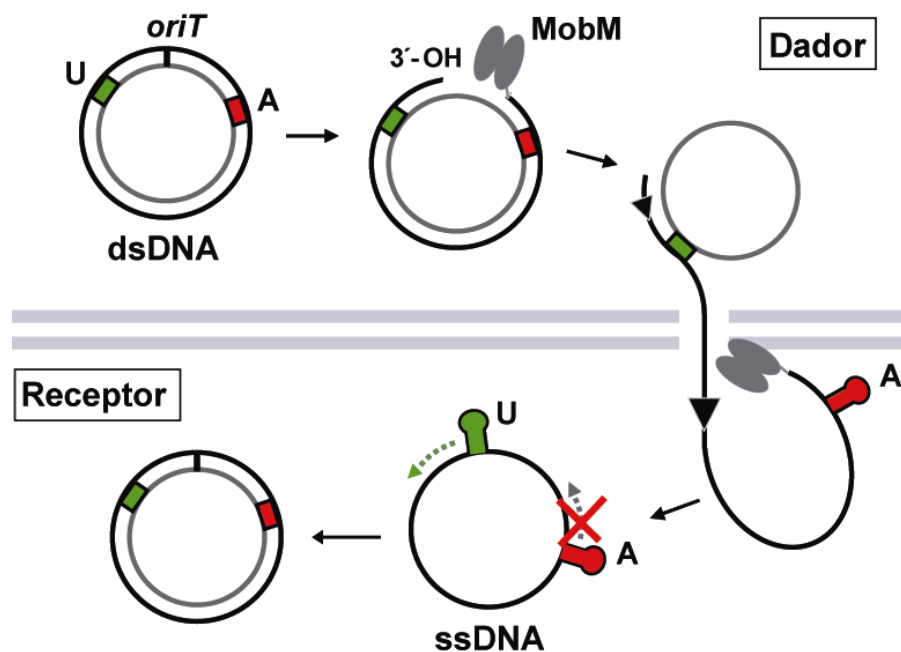


Figura 75. Modelo de síntesis de doble cadena después de la transferencia de pMV158.

MobM corta en *oriT* y queda unida al extremo 5'. Mediante la proteína de acoplamiento (CP), el complejo DNA-MobM es transferido hacia la célula receptora a través de un sistema de secreción de tipo IV, codificado en el plásmido auxiliar pAM β 1. El origen *ssoA* (A) es el primero en entrar en la célula receptora y, tras estructurarse adecuadamente, es reconocido por la RNAP para iniciar la síntesis de la cadena complementaria. Si la interacción entre el *ssoA* y la RNAP del nuevo huésped no es eficiente (cruz roja), la síntesis de DNA solo tiene lugar desde el origen *ssoU* (U), el cuál es el último elemento que entra en el receptor.

El modelo que aquí proponemos (Fig. 75) predice que, al menos en plásmidos RC pequeños como pMV158, la reconversión del DNA transferido por conjugación a una molécula de cadena doble, se inicia mediante la síntesis de un cebador de RNA desde un origen de cadena retrasada de forma equivalente a la replicación vegetativa. Cuando pMV158 coloniza un nuevo huésped por transformación, el DNA se fragmenta

Discusión

e introduce en estado monocatenario mediante un proceso degradativo de transporte (López *et al.*, 1982; Claverys *et al.*, 2009). La reconstitución de una molécula intacta del plásmido tiene lugar por síntesis y/o recombinación, seguida de replicación por círculo rodante de la cadena líder desde el *dso* (Fig. 1). Sin embargo, la colonización de un huésped por movilización conjugativa de pMV158 implica, primero la replicación de la cadena complementaria desde un *sso*, y luego replicación desde el *dso*. Por ello, podemos sugerir que el papel del *sso* es más relevante en los primeros estadios del establecimiento de un plásmido en un nuevo huésped por la vía de la conjugación.

CONCLUSIONES

1. La transcripción del gen *mobM* puede iniciarse desde diferentes promotores dependiendo del huésped bacteriano de pMV158. Estos promotores coinciden (*S. pneumoniae* y *L. lactis*) o solapan (*E. coli*) con el *oriT*, de manera que MobM podría regular su propia síntesis dependiendo del contexto genómico.
2. Los plásmidos movilizables de la familia de replicación de pMV158 son portadores de relaxasas de tipo MOB_V, lo cual sugiere la existencia de un ancestro común.
3. La actividad de unión y corte de DNA (dominio relaxasa) de MobM se localiza en la región N-terminal de la proteína (primeros 200 residuos), mientras que el dominio de oligomerización se encuentra en la región C-terminal.
4. El dominio relaxasa de MobM se renaturaliza parcialmente tras una desnaturalización térmica lenta, y mantiene la actividad de corte y cierre sobre DNA superenrollado.
5. MobM tiene una afinidad elevada por iones Mn²⁺. Este catión es el único que, conjuntamente, soporta la actividad catalítica y aporta estabilidad térmica al dominio relaxasa de la proteína MobM.
6. El origen de transferencia de pMV158 tiene tres repeticiones invertidas en una región compacta de 41 pb. En el DNA superenrollado de pMV158 se generan estructuras secundarias de tipo tallo-lazo con la secuencia de IR1 e IR3.
7. MobM reconoce una estructura cruciforme de tipo IR3 en el *oriT* de pMV158 y separa el DNA que incluye el sitio de corte, mediante el desplazamiento hacia una estructura de tipo IR1. La secuencia IR2 parece no tener un papel importante, al menos en las interacciones que se establecen entre MobM y el DNA superenrollado de pMV158.
8. La secuencia mínima del *oriT* en estado monocatenario contiene la repetición invertida IR1 más ocho nucleótidos que se extienden a 3' hasta el sitio de corte de MobM.
9. La estructura cristalina del dominio relaxasa de MobM es la primera que se obtiene implicada en el sistema de movilización de un plásmido de bacterias Gram positivas.

Conclusiones

10. La estructura global del dominio relaxasa de MobM es homóloga a la de las relaxasas de estructura conocida, y consiste en una lámina central formada por varias cadenas- β antiparalelas, rodeada por un conjunto de hélices- α .
11. El complejo observado por cristalografía de rayos X entre MobMN199 y el oligonucleótido IR1+8 (definido como el *oriT* mínimo) corresponde a la conformación adoptada en el inicio de la transferencia.
12. Los requerimientos estructurales para la actividad de corte de MobM dependen de la topología del sustrato. La versión truncada MobMN199 es activa sobre DNA superenrollado, pero no sobre DNA monocatenario. MobMN243 presenta actividad de corte, tanto con DNA superenrollado como monocatenario. Las hélices- α extra de esta nueva versión podrían dirigir el DNA monocatenario hacia el centro activo.
13. La tirosina en posición 44, propuesta como el aminoácido implicado en el corte del DNA, no es el residuo catalítico. En función a los datos estructurales y funcionales, los aminoácidos Y122, H22 y E82 podrían actuar como residuos catalítico, ácido y básico, respectivamente dentro del centro activo de MobM. A su vez, las histidinas H126, H133 y H135 coordinarían el átomo de Mn^{2+} .
14. El origen de cadena retrasada *ssoU* es un elemento esencial para la propagación del plásmido pMV158 desde *Streptococcus* a especies de otros géneros bacterianos.
15. La funcionalidad de un origen de cadena retrasada (*sso*) es imprescindible para la transferencia conjugativa de los plásmidos RC.

BIBLIOGRAFÍA

- Ammor**, M. S., M. Gueimonde, M. Danielsen, M. Zagorec, A. H. A. M. van Hoek, C. G. de los Reyes-Gavilan, B. Mayo & A. Margolles, (2008) Two Different Tetracycline Resistance Mechanisms, Plasmid-Carried *tet(L)* and Chromosomally Located Transposon-Associated *tet(M)*, Coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1394-1401.
- Anthony, K. G., C. Sherburne, R. Sherburne & L. S. Frost, (1994) The role of the pilus in recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids. *Mol Microbiol* **13**: 939-953.
- Aravind, L. & E. V. Koonin, (1999) DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res.* **27**: 4658-4670.
- Arrondo, J. L. R., I. Echabe, I. Iloro, M. A. Hernando, F. de la Cruz & F. M. Goñi, (2003) A bacterial TrwC relaxase domain contains a thermally stable α -helical core. *J. Bacteriol* **185**: 4226-4232.
- Avila, P., B. Núñez & F. de la Cruz, (1996) Plasmid R6K contains two functional *oriTs* which can assemble simultaneously in relaxosomes *in vivo*. *Journal of Molecular Biology* **261**: 135-143.
- Bates**, E. E. M. & H. J. Gilbert, (1989) Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Gene* **85**: 253-258.
- Becker, E. C. & R. J. Meyer, (2000) Recognition of *oriT* for DNA processing at termination of a round of conjugal transfer. *J. Mol. Biol.* **300**: 1067-1077.
- Becker, E. C. & R. J. Meyer, (2002) MobA, the DNA strand transferase of plasmid R1162: The minimal domain required for DNA processing at the origin of transfer. *J. Biol. Chem.* **277**: 14575-14580.
- Becker, E. C. & R. J. Meyer, (2003) Relaxed Specificity of the R1162 Nickase: a Model for Evolution of a System for Conjugative Mobilization of Plasmids. *J. Bacteriol.* **185**: 3538-3546.
- Beranek, A., M. Zettl, K. Lorenzoni, A. Schauer, M. Manhart & G. Koraimann, (2004) Thirty-Eight C-Terminal Amino Acids of the Coupling Protein TraD of the F-Like Conjugative Resistance Plasmid R1 Are Required and Sufficient To Confer Binding to the Substrate Selector Protein TraM. *J. Bacteriol.* **186**: 6999-7006.
- Bhattacharjee, M., X.-M. a. Rao & R. J. Meyer, (1992) Role of the origin of transfer in termination of strand transfer during bacterial conjugation. *J. Bacteriol.* **174**: 6659-6665.
- Birnboim, H. C. & J. Doly, (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Boer, D. R., J. A. Ruíz-Masó, J. R. López-Blanco, A. G. Blanco, M. Vives-Llàcer, P. Chacón, I. Usón, F. X. Gomis-Rüth, M. Espinosa, O. Llorca, G. del Solar & M. Coll, (2009) Plasmid replication initiator RepB forms a hexamer reminiscent of ring helicases and has mobile nuclease domains. *EMBO J.* **28**: 1666-1678.
- Boer, R., S. Russi, A. Guasch, M. Lucas, A. G. Blanco, R. Pérez-Luque, M. Coll & F. de la Cruz, (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.
- Brandts, J. F. & L. N. Lin, (1990) Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **29**: 6927-6940.
- Browning, D. F. & S. J. W. Busby, (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Micro* **2**: 57-65.
- Budisa, N., B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann & R. Huber, (1995) High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**: 788-796.

- Burdett, V., (1980) Identification of tetracycline-resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**: 753-760.
- Byrd, D., J. Sampson, H. Ragonese & S. Matson, (2002) Structure-Function Analysis of *Escherichia coli* DNA Helicase I Reveals Non-overlapping Transesterase and Helicase Domains. *J. Biol. Chem.* **277**: 42645-42653.
- C**abezon, E. & F. de la Cruz, (2006) TrwB: An F1-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation. *Research in Microbiology* **157**: 299-305.
- Camacho, E. M. & J. Casadesús, (2005b) Regulation of *traJ* transcription in the *Salmonella* virulence plasmid by strand-specific DNA adenine hemimethylation. *Molecular Microbiology* **57**: 1700-1718.
- Camacho, E. M., A. Serna, C. Madrid, S. Marqués, R. Fernández, F. de la Cruz, A. Juárez & J. Casadesús, (2005a) Regulation of *finP* transcription by DNA adenine methylation in the virulence plasmid of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol* **187**: 5691-5699.
- Cascales, E. & P. J. Christie, (2004a) Definition of a Bacterial Type IV Secretion Pathway for a DNA Substrate. *Science* **304**: 1170-1173.
- Cascales, E. & P. J. Christie, (2004b) *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17228-17233.
- Cesar, C. E., C. Machón, F. de la Cruz & M. Llosa, (2006) A new domain of conjugative relaxase TrwC responsible for efficient *oriT*-specific recombination on minimal target sequences *Mol Microbiol* **62**: 984-996.
- Claverys, J. P., B. Martin & P. Polard, (2009) The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 643-656.
- Clewell, D. B., M. V. Francia, S. E. Flannagan & Y. Florence, (2002) Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid* **48**: 193-201.
- Costa, M., M. Solá, G. del Solar, R. Eritja, A. M. Hernández-Arriaga, M. Espinosa, F. X. Gomis-Rüth & M. Coll, (2001) Plasmid transcriptional repressor CopG oligomerises to render helical superstructures unbound and in complexes with oligonucleotides. *J. Mol. Biol.* **310**: 403-417.
- Csitkovits, V. C., D. Thermic & E. L. Zechner, (2004) Concomitant Reconstitution of Tral-catalyzed DNA Transesterase and DNA Helicase Activity *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* **279**: 45477-45484.
- Chattoraj, D., (2000) Control of plasmid replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol. Microbiol.* **37**: 467-476.
- Chen, I., P. J. Christie & D. Dubnau, (2005) The Ins and Outs of DNA Transfer in Bacteria. *Science* **310**: 1456-1460.
- Christie, P. J., (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* **40**: 294-305.
- D**atta, S. & R. W. Hedges, (1971) Compatibility groups among fi - R factors. *Nature* **234**: 222-223.
- Datta, S., C. Larkin & J. F. Schildbach, (2003) Structural insights into single-stranded DNA binding and cleavage by F factor Tral. *Structure* **11**: 1369-1379.
- de Antonio, C., M. E. Farias, M. G. de Lacoba & M. Espinosa, (2004) Features of the plasmid pMV158-encoded MobM, a protein involved in its mobilization. *Journal of Molecular Biology* **335**: 733-743.

- de la Campa, A. G., G. del Solar & M. Espinosa, (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., A. Marcobal & R. Muñoz, (2004) Complete nucleotide sequence and structural organization of pPB1, a small *Lactobacillus plantarum* cryptic plasmid that originated by modular exchange. *Plasmid* **52**: 203-211.
- del Solar, G., J. C. Alonso, M. Espinosa & R. Díaz-Orejas, (1996) Broad host range plasmid replication: an open question. *Mol. Microbiol.* **21**: 661-666.
- del Solar, G., R. Díaz & M. Espinosa, (1987a) Replication of the streptococcal plasmid pMV158 and derivatives in cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 428-435.
- del Solar, G. & M. Espinosa, (2000) Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol. Microbiol.* **37**: 492-500.
- del Solar, G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarría, M. Espinosa & R. Díaz-Orejas, (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 434-464.
- del Solar, G., M. Moscoso & M. Espinosa, (1993) Rolling circle-replicating plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria: a wall falls. *Mol. Microbiol.* **8**: 789-796.
- del Solar, G., J. Pérez-Martín & M. Espinosa, (1990) Plasmid pLS1-encoded RepA protein regulates transcription from *repAB* promoter by binding to a DNA sequence containing a 13-base pair symmetric element. *J. Biol. Chem.* **265**: 12569-12575.
- del Solar, G., A. Puyet & M. Espinosa, (1987b) Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the streptococcal plasmid pLS1. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5561-5580.
- Derbyshire, K. M., G. Hatfull & N. Willetts, (1987) Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: a genetic and DNA sequence analysis of the mobilization region. *Mol Gen Genet* **206**: 161-168.
- Di Laurenzio, L., L. S. Frost & W. Paranchych, (1992) The TraM protein of the conjugative plasmid F binds to the origin of transfer of the F and ColE1 plasmid. *Mol Microbiol* **6**: 2951-2959.
- Ding, Z., K. Atmakuri & P. J. Christie, (2003) The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends in Microbiology* **11**: 527-535.
- Disque-Kochem, C. & B. Dreiseikelmann, (1997) The cytoplasmic DNA-binding protein TraM binds to the inner membrane protein TraD *in vitro*. *J. Bacteriol.* **179**: 6133-6137.
- Dower, W. J., J. F. Miller & C. W. Ragsdale, (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Draper, O., C. E. Cesar, C. Machon, F. de la Cruz & M. Llosa, (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *PNAS* **102**: 16385-16390.
- Dunny, G. M. & B. A. B. Leonard, (1997) Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* **51**: 527.
- Erickson, M. J. a. & R. J. Meyer, (1993) The origin of greater-than-unit-length plasmids generated during bacterial conjugation. *Mol. Microbiol.* **7**: 289-298.
- Espinosa, M., (*en preparación*) Rolling circle-replicating plasmids: the growing family of the promiscuous replicon pMV158. *Plasmid*.
- Espinosa, M., S. Cohen, M. Couturier, G. del Solar, R. Diaz-Orejas, R. Giraldo, L. Janniére, C. Miller, M. Osborn & C. M. Thomas, (2000) Plasmid replication and copy number control. pp. 87-174. In: The horizontal gene pool. C. M. Thomas (ed). Amsterdam: Harwood Academic publishers. pp. 1-50.

- Espinosa, M., P. López, M. T. Pérez-Ureña & S. A. Lacks, (1982) Interspecific plasmid transfer between *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*: 195-201.
- Espinosa, M., J. A. Ruiz-Masó, F. Lorenzo-Díaz & G. del Solar, (2005) Of rolling-circle replication and conjugative transfer: variations on a protein-DNA interplay. *Plasmid* **53**: 27.
- Farías, M. E. & M. Espinosa, (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.
- Farías, M. E., E. Grohmann & M. Espinosa, (1999) Expression of the *mobM* gene of the streptococcal plasmid pMV158 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**: 403-410.
- Fernández-López, R., C. Machón, C. M. Longshaw, S. Martin, S. Molin, E. L. Zechner, M. Espinosa, E. Lanka & F. de la Cruz, (2005) Unsaturated fatty acids are inhibitors of bacterial conjugation. *Microbiology* **151**: 3517-3526.
- Flashner, Y., J. Shlomei & A. Shafferman, (1996) Three novel plasmid R6K proteins act in concert to distort DNA within the *alpha* and *beta* origins of DNA replication. *Mol. Microbiol* **19**: 985-996.
- Francia, M. V. & D. B. Clewell, (2002) Transfer origins in the conjugative *Enterococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAM373: identification of the pAD1 *nic* site, a specific relaxase and a possible TraG-like protein. *Molecular Microbiology* **45**: 375-395.
- Francia, M. V., A. Varsaki, M. P. Garcillán-Barcia, A. Latorre, C. Drainas & F. de la Cruz, (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: 79-100.
- Fronzes, R., E. Schafer, L. Wang, H. R. Saibil, E. V. Orlova & G. Waksman, (2009) Structure of a Type IV Secretion System Core Complex. *Science* **323**: 266-268.
- Frost, L. S., R. Leplae, A. O. Summers & A. Toussaint, (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Micro* **3**: 722-732.
- Fürste, J. P., W. Pansegrau, G. Ziegelin, M. a. Kröger & E. Lanka, (1989) Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: Interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. *PNAS* **86**: 1171-1175.
- Fukuda, H. a. & E. Ohtsubo, (1997) Roles of Tra I protein with activities of cleaving and rejoining the single-stranded DNA in both initiation and termination of conjugal DNA transfer. *Genes to Cell* **2**: 735-751.
- Furuya, N. & T. Komano, (1997) Mutational analysis of the R64 *oriT* region: requirement for precise location of the NikA-binding sequence. *J. Bacteriol.* **179**: 7291-7297.
- Furuya, N. & T. Komano, (2000) Initiation and termination of DNA transfer during conjugation of IncI1 plasmid R64: roles of two sets of inverted repeat sequences within *oriT* in termination of R64 transfer. *J. Bacteriol.* **182**: 3191-3196.
- Garcillán-Barcia, M. P. & F. de la Cruz, (2008) Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* **60**: 1 - 18.
- Garcillán-Barcia, M. P., M. V. Francia & F. de la Cruz, (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 657-687.
- Garcillán-Barcia, M. P., P. Jurado, B. González-Pérez, G. Moncalián, L. A. Fernández & F. de la Cruz, (2007) Conjugative transfer can be inhibited by blocking

- relaxase activity within recipient cells with intrabodies. *Molecular Microbiology* **63**: 404-416.
- Gomis-Rüth, F. X. & M. Coll, (2006) Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation. *Current opinion in structural biology* **16**: 744-752.
- Gomis-Rüth, F. X., G. Moncalián, R. Pérez-Luque, A. González, E. Cabezón, F. de la Cruz & M. Coll, (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F₁-ATPase. *Nature* **409**: 637-641.
- Gomis-Rüth, F. X., M. Solá, P. Acebo, A. Párraga, A. Guasch, R. Eritja, A. González, M. Espinosa, G. del Solar & M. Coll, (1998) The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J.* **17**: 7404-7415.
- González-Pérez, B., J. D. Carballeira, G. Moncalián & F. de la Cruz, (2009) Changing the recognition site of a conjugative relaxase by rational design. *Biotechnology Journal* **4**: 554-557.
- González-Pérez, B., M. Lucas, L. A. Cooke, J. S. Vyle, F. de la Cruz & G. Moncalián, (2007) Analysis of DNA processing reactions in bacterial conjugation by using suicide oligonucleotides. *EMBO J.* **26**: 3847-3857.
- Grandoso, G., P. Avila, A. Cayon, M. A. Hernando, M. Llosa & F. de la Cruz, (2000) Two active-site tyrosyl residues of protein TrwC act sequentially at the origin of transfer during plasmid R388 conjugation. *Journal of Molecular Biology* **295**: 1163-1172.
- Griffith, F., (1928) The significance of pneumococcal types. *J Hyg* **27**: 113-159.
- Grohmann, E., L. M. Guzmán & M. Espinosa, (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., G. Muth & M. Espinosa, (2003) Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 277-301.
- Grohmann, E., E. L. Zechner & M. Espinosa, (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.
- Gruss, A. D., H. F. Ross & R. P. Novick, (1987) Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2165-2169.
- Guasch, A., M. Lucas, G. Moncalián, M. Cabezas, R. Pérez-Luque, F. X. Gomis-Rüth, F. de la Cruz & M. Coll, (2003) Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC. *Nature Structural Biology* **10**: 1002-1010.
- Gubbins, M. J., D. C. Arthur, A. F. Ghetu, J. N. M. Glover & L. S. Frost, (2003) Characterizing the Structural Features of RNA/RNA Interactions of the F-plasmid FinOP Fertility Inhibition System. *J. Biol. Chem.* **278**: 27663-27671.
- Guzmán, L. & M. Espinosa, (1997) The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J. Mol. Biol.* **266**: 688-702.
- H**aase, J., M. Kalkum & E. Lanka, (1996) TrbK, a small cytoplasmic membrane lipoprotein, functions in entry exclusion of the IncP *alpha* plasmid RP4. *J. Bacteriol.* **178**: 6720-6729.
- Hekman, K., K. Guja, C. Larkin & J. F. Schildbach, (2008) An intrastrand three-DNA-base interaction is a key specificity determinant of F transfer initiation and of F^{Tral} relaxase DNA recognition and cleavage. *Nucl. Acids Res.* **36**: 4565-4572.

- Hernández-Arriaga, A. M., M. Espinosa & G. del Solar, (2000) A functional lagging strand origin does not stabilize plasmid pMV158 inheritance in *Escherichia coli*. *Plasmid* **43**: 49-58.
- Hernandez-Arriaga, A. M., T. S. Rubio-Lepe, M. Espinosa & G. del Solar, (2009) Repressor CopG prevents access of RNA polymerase to promoter and actively dissociates open complexes. *Nucl. Acids Res.* **37**: 4799-4811.
- Horinouchi, S. & B. Weisblum, (1982) Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamine, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* **150**: 804-814.
- Howard, M. T., W. C. Nelson & S. W. Matson, (1995) Stepwise Assembly of a Relaxosome at the F Plasmid Origin of Transfer. *J. Biol. Chem.* **270**: 28381-28386.
- Ilyina, T. & E. Koonin, (1992) Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eukaryotes and archaeobacteria. *Nucl. Acids Res.* **20**: 3279-3285.
- Janniere, L., C. Bruand & S. D. Ehrlich, (1990) Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors. *Gene* **87**: 53-61.
- Johnsen, A. R. & N. Kroer, (2007) Effects of stress and other environmental factors on horizontal plasmid transfer assessed by direct quantification of discrete transfer events. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 718-728.
- Khan, S. A., (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 442-455.
- Khan, S. A. & R. P. Novick, (1983) Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **10**: 251-259.
- Kimura, Y., L.-J. Yu, Y. Hirano, H. Suzuki & S.-Y. Wang, (2009) Calcium ions are required for the enhanced thermal stability of the light-harvesting-reaction center core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*. *J. Biol. Chem* **284**: 93-99.
- Kopek, J., A. Bergmann, G. Fritz, E. Grohmann & W. Keller, (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.
- Kramer, M. G., M. Espinosa, T. K. Misra & S. A. Khan, (1998a) Lagging strand replication of rolling-circle plasmids: specific recognition of the *ssoA*-type origins in different gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10505-10510.
- Kramer, M. G., M. Espinosa, T. K. Misra & S. A. Khan, (1999) Characterization of a single-strand origin, *ssoU*, required for broad host range replication of rolling-circle plasmids. *Mol. Microbiol.* **33**: 466-475.
- Kramer, M. G., S. A. Khan & M. Espinosa, (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.
- Kramer, M. G., S. A. Khan & M. Espinosa, (1998b) Lagging-strand replication from the *ssoA* origin of plasmid pMV158 in *Streptococcus pneumoniae*: *in vivo* and *in vitro* influences of mutations in two conserved *ssoA* regions. *J. Bacteriol.* **180**: 83-89.
- Kurenbach, B., D. Grothe, M. E. Farías & E. Grohmann, (2002) The *tra* region of the conjugative plasmid pIP501 is organized in an operon with the first gene encoding the relaxase. *J. Bacteriol.* **184**: 1801-1805.
- Lacks, S., (1966) Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* **53**: 207-235.

- Lacks, S. & B. Greenberg, (1977) Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *Journal of Molecular Biology* **114**: 153-168.
- Lacks, S., P. López, B. Greenberg & M. Espinosa, (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.
- Lanka, E. & B. M. Wilkins, (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 141-169.
- Larkin, C., S. Datta, M. J. Harley, B. J. Anderson, A. Ebie, V. Hargreaves & J. F. Schildbach, (2005) Inter- and Intramolecular Determinants of the Specificity of Single-Stranded DNA Binding and Cleavage by the F Factor Relaxase. *Structure* **13**: 1533.
- Larkin, C., R. J. F. Haft, M. J. Harley, B. Traxler & J. F. Schildbach, (2007) Roles of active site residues and the HUH motif of the F plasmid Tral relaxase. *J. Biol. Chem.* **282**: 33707–33713.
- Lawley, T. D., G. S. Gordon, A. Wright & D. E. Taylor, (2002) Bacterial conjugative transfer: visualization of successful mating pairs and plasmid establishment in live *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **44**: 947.
- Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins & L. S. Frost, (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**: 1-15.
- Lopez, J., P. Crespo, J. C. Rodriguez, I. Andres & J. M. Ortiz, (1989) Analysis of IncF plasmids evolution: nucleotide sequence of an IncFIII replication region. *Gene* **78**: 183-187.
- López, P., M. Espinosa, D. L. Stassi & S. A. Lacks, (1982) Facilitation of plasmid transfer in *Streptococcus pneumoniae* by chromosomal homology. *J. Bacteriol.* **150**: 692-701.
- Lorenzo-Díaz, F. & M. Espinosa, (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. & M. Espinosa, (2009b) Lagging strand DNA replication origins are required for conjugal transfer of the promiscuous plasmid pMV158. *J. Bacteriol.* **191**: 720–727.
- Luo, Y., Q. Gao & R. C. Deonier, (1994) Mutational and physical analysis of F plasmid TraY protein binding to *oriT*. *Mol Microbiol* **11**: 459-469.
- Llosa, M., S. Bolland & F. de la Cruz, (1994a) Genetic Organization of the Conjugal DNA Processing Region of the IncW Plasmid R388. *Journal of Molecular Biology* **235**: 448-464.
- Llosa, M., S. Bolland, G. Grandoso & F. de la Cruz, (1994b) Conjugation-independent, site-specific recombination at the *oriT* of the IncW plasmid R388 mediated by TrwC. *J. Bacteriol.* **176**: 3210-3217.
- Llosa, M., G. Grandoso, M. A. Hernando & F. de la Cruz, (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., C. Roy & C. Dehio, (2009) Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Molecular Microbiology* **73**: 141-151.
- Llosa, M., S. Zunzunegui & F. de la Cruz, (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., E. F. Fritsch & J. Sambrook, (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.*

- Matson, S. W., J. K. Sampson & D. R. N. Byrd, (2001) F Plasmid Conjugative DNA Transfer: the Tral helicase activity is essential for DNA strand transfer. *J. Biol. Chem.* **276**: 2372-2379.
- Meyer, R., (2009) Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid* **62**: 57-70.
- Minchin, S. D. & S. J. W. Busby, (2009) Analysis of mechanisms of activation and repression at bacterial promoters. *Methods* **47**: 6-12.
- Moncalián, G., G. Grandoso, M. Llosa & F. de la Cruz, (1997) *OriT*-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J. Mol. Biol.*: 188-200.
- Moncalian, G., M. Valle, J. M. Valpuesta & F. de la Cruz, (1999a) IHF protein inhibits cleavage but not assembly of plasmid R388 relaxosomes. *Mol. Microbiol.* **31**: 1643-1652.
- Monzinger, A. F., A. Ozburn, S. Xia, R. J. Meyer & J. D. Robertus, (2007) The structure of the minimal relaxase domain of MobA at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol* **366**: 165-178.
- Murray, B. E., K. V. Singh, R. P. Ross, J. D. Heath, G. M. Dunny & G. M. Weinstock, (1993) Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function. *J. Bacteriol.* **175**: 5216-5223.
- Murray, K. D., K. A. Aronstein & J. H. de León, (2007) Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Plasmid* **58**: 89-100.
- N**akamura, M., K. Ogata, T. Nagamine, K. Tajima, H. Matsui & Y. Benno, (2000) Characterization of the cryptic plasmid pSBO2 isolated from *Streptococcus bovis* JB1 and construction of a new shuttle vector. *Curr. Microbiol.* **41**: 27-32.
- Nelson, W. C., B. S. Morton, E. E. a. Lahue & S. W. Matson, (1993) Characterization of the Escherichia coli F factor traY gene product and its binding site. *J. Bacteriol.* **175**: 2221-2228.
- Nieto, C. & M. Espinosa, (2003) Construction of the mobilizable plasmid pMV158GFP, a derivative of pMV158 that carries the gene encoding the Green Fluorescent Protein. *Plasmid* **49**: 281-285.
- Nieto, C., P. Fernández de Palencia, P. López & M. Espinosa, (2000) Construction of a tightly regulated plasmid vector for *Streptococcus pneumoniae*: controlled expression of the Green Fluorescent Protein. *Plasmid* **43**: 205-213.
- Nieto, C., A. Puyet & M. Espinosa, (2001) MalR-mediated Regulation of the *Streptococcus pneumoniae malIMP* Operon at Promoter P_M. Influence of a proximal divergent promoter region and competition between MalR and RNA polymerase proteins. *J. Biol. Chem.* **276**: 14946-14954.
- Novick, R. P., (1998) Contrasting lifestyles of rolling-circle phages and plasmids. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 434-438.
- Núñez, B. & F. de la Cruz, (2001) Two atypical mobilization proteins are involved in plasmid CloDF13 relaxation. *Mol. Microbiol.* **39**: 1088-1099.
- O**ger, P. & S. K. Farrand, (2002) Two Opines Control Conjugal Transfer of an Agrobacterium Plasmid by Regulating Expression of Separate Copies of the Quorum-Sensing Activator Gene *traR*. *J. Bacteriol.* **184**: 1121-1131.
- P**ansegrau, W. & E. Lanka, (1996a) Mechanisms of initiation and termination reactions in conjugative DNA processing: independence of tight substrate binding and catalytic activity of relaxase (Tral) of IncP *alpha* plasmid RP4. *J. Biol. Chem* **271**: 13068-13076.

- Pansegrau, W. & E. Lanka, (1996b) Enzymology of DNA strand transfer by conjugative mechanisms. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol* **54**: 197-251.
- Pansegrau, W., W. Schröder & E. Lanka, (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., W. Schröder & E. Lanka, (1994) Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalyzed by relaxase (TraI) of conjugative plasmid RP4. *J. Biol. Chem* **269**: 2782-2789.
- Pansegrau, W., G. Ziegelin & E. Lanka, (1990) Covalent association of the *tral* gene product of plasmid RP4 with the 5'-terminal nucleotide at the relaxation nick site. *J. Biol. Chem.* **265**: 10637-10644.
- Parker, C., E. Becker, X. Zhang, S. Jandle & R. Meyer, (2005b) Elements in the co-evolution of relaxases and their origins of transfer. *Plasmid* **53**: 113-118.
- Parker, C. & R. Meyer, (2005a) Mechanisms of Strand Replacement Synthesis for Plasmid DNA Transferred by Conjugation. *J. Bacteriol.* **187**: 3400-3406.
- Pérez-Mendoza, D. & F. de la Cruz, (2009) *Escherichia coli* genes affecting recipient ability in plasmid conjugation: Are there any? *BMC Genomics* **10**: 71.
- Priebe, S. D. & S. A. Lacks, (1989) Region of the streptococcal plasmid pMV158 required for conjugative mobilization. *J. Bacteriol.* **171**: 4778-4784.
- Projan, S. J., S. Carleton & R. P. Novick, (1983) Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* **9**: 182-190.
- Provencher, S. W. & J. Glöckner, (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**: 33-37.
- Ragonese, H., D. Haisch, E. Villareal, J.-H. Choi & S. W. Matson, (2007) The F plasmid-encoded TraM protein stimulates relaxosome-mediated cleavage at *oriT* through an interaction with TraI. *Molecular Microbiology* **63**: 1173-1184.
- Rasooly, A., P.-Z. Wang & R. P. Novick, (1994) Replication-specific conversion of the *Staphylococcus aureus* pT181 initiator protein from an active homodimer to an inactive heterodimer. *EMBO J.* **13**: 5245-5251.
- Richard, A. J., C. C. Liu, A. L. Klinger, M. J. Todd, T. M. Mezzasalma & V. J. LiCata, (2006) Thermal stability landscape for Klenow DNA polymerase as a function of pH and salt concentration. *Biochem. Biophys. Acta (Proteins and Proteomics)*. **1764**: 1546-1552.
- Riede, I. & M.-L. Eschbach, (1986) Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **205**: 241-245.
- Rosch, J., G. Gao, G. Ridout, Y. Wang & E. Tuomanen, (2009) Role of the manganese efflux system *mntE* for signalling and pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **72**: 12-25.
- Ruiz-Masó, J. A., C. Lopez-Zumel, M. Menendez, M. Espinosa & G. del Solar, (2004) Structural features of the initiator of replication protein RepB encoded by the promiscuous plasmid pMV158. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1696**: 113-119.
- Ruiz-Maso, J. A., R. Lurz, M. Espinosa & G. del Solar, (2007) Interactions between the RepB initiator protein of plasmid pMV158 and two distant DNA regions within the origin of replication. *Nucl. Acids Res.* **35**: 1230-1244.
- Russi, S., (2009) *Tesis doctoral: Estudios estructurales de relaxasas involucradas en el proceso de conjugación bacteriana*. Universitat Autònoma de Barcelona (Director: Miquel Coll).
- Sánchez-Ruiz, J., (1992) Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys J* **61**: 921-935.
- Sánchez, C. & B. Mayo, (2003) Sequence and analysis of pBM02, a novel RCR cryptic plasmid from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* P8-2-47. *Plasmid* **49**: 118-129.

- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467.
- Sano, K., M. Otani, Y. Okada, R. Kawamura, M. Umesaki, Y. Ohi, C. Umezawa & K. Kanatani, (1997) Identification of the replication region of the *Lactobacillus acidophilus* plasmid pLA106. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**: 223-226.
- Schlx, P. J., M. W. Capp & M. T. Record, (1995) Inhibition of transcription initiation by *lac* repressor. *J. Mol. Biol.* **245**: 331-350.
- Schröder, G., S. Krause, E. L. Zechner, B. Traxler, H.-J. Yeo, R. Lurz, G. Waksman & E. Lanka, (2002) TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the *Helicobacter pilori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates? *J. Bacteriol.* **184**: 2767-2779.
- Sherburne, C. K., T. D. Lawley, M. W. Gilmour, F. R. Blattner, V. Burland, E. Grotbeck, D. J. Rose & D. E. Taylor, (2000) The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucl. Acids Res.* **28**: 2177-2186.
- Shi, K., C. K. Brown, Z.-Y. Gu, B. K. Kozlowski, G. M. Dunny, D. H. Ohlendorf & C. A. Earhart, (2005) Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 18596-18601.
- Smith, C. J. & A. C. Parker, (1998) The Transfer Origin for Bacteroides Mobilizable Transposon Tn4555 Is Related to a Plasmid Family from Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* **180**: 435-439.
- Smith, M. D., N. B. Shoemaker, V. Burdett & W. R. Guild, (1980) Transfer of plasmids by conjugation in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* **3**: 70-79.
- Somkuti, G. A. & D. H. Steinberg, (2007) Molecular organization of plasmid pER13 in *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol Lett.* **29**: 1991-1999.
- Spaink, H. P., R. Okker, C. Wijffelman, E. Pees & B. Lugtengerg, (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRLIJ. *Plant Molecular Biology* **9**: 27-39.
- Spiess, E. & R. Lurz, (1988) Electron microscopic analysis of nucleic acids and nucleic acid-protein complexes. *Methods Microbiol.* **20**: 293-323.
- Sreerama, N. & R. W. Woody, (2000) Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry* **287**: 252-260.
- Stassi, D. L., P. López, M. Espinosa & S. A. Lacks, (1981) Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *PNAS* **78**: 7028-7032.
- Street, L. M., M. J. Harley, J. C. Stern, C. Larkin, S. L. Williams, D. L. Miller, J. A. Dohm, M. E. Rodgers & J. F. Schildbach, (2003) Subdomain organization and catalytic residues of the F factor Tral relaxase domain. *Biochem. Biophys. Acta.* **1646**: 86-99.
- Studier, F. W. & B. A. Moffatt, (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**: 113-130.
- Szipirer, C. Y., M. Faelen & M. Couturier, (2001) Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *J. Bacteriol.* **183**: 2101-2110.
- Takamatsu, D., M. Osaki & T. Sekizaki, (2000) Sequence analysis of a small cryptic plasmid isolated from *Streptococcus suis* serotype 2. *Curr. Microbiol.* **40**: 61-66.
- te Riele, H., B. Michel & S. D. Ehrlich, (1986) Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2541-2545.

- Tsai, M. M., Y. H. Fu & R. C. Deonier, (1990) Intrinsic bends and integration host factor binding at F plasmid *oriT*. *J. Bacteriol.* **172**: 4603-4609.
- Turgeon, N. & S. Moineau, (2001) Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family. **45**: 171-183.
- V**arsaki, A., M. Lucas, A. S. Afendra, C. Drainas & F. de la Cruz, (2003) Genetic and biochemical characterization of MbeA, the relaxase involved in plasmid ColE1 conjugative mobilization. *Mol. Microbiol.* **48**: 481-493.
- Vedantam, G., S. Knopf & D. W. Hecht, (2006) *Bacteroides fragilis* mobilizable transposon Tn5520 requires a 71 base pair origin of transfer sequence and a single mobilization protein for relaxosome formation during conjugation. *Molecular Microbiology* **59**: 288-300.
- Vujcic, M. & L. Topisirovic, (1993) Molecular analysis of the rolling-circle replicating plasmid pA1 of *Lactobacillus plantarum* A112. *Appl. Environm. Microbiol.*: 274-280.
- W**aldron, K. J. & N. J. Robinson, (2009a) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 25-35.
- Waldron, K. J., J. C. Rutherford, D. Ford & N. J. Robinson, (2009b) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**: 823-830.
- Waters, V. L. & D. G. Guiney, (1993) Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling-circle replication. *Mol. Microbiol.* **9**: 1123-1130.
- Will, W. R. & L. S. Frost, (2006a) Hfq Is a Regulator of F-Plasmid TraJ and TraM Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**: 124-131.
- Will, W. R. & L. S. Frost, (2006b) Characterization of the Opposing Roles of H-NS and TraJ in Transcriptional Regulation of the F-Plasmid *tra* Operon. *J. Bacteriol.* **188**: 507-514.
- Willetts, N. & B. Wilkins, (1984) Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **48**: 24-41.
- Williams, S. L. & J. F. Schildbach, (2006) Examination of an inverted repeat within the F factor origin of transfer: context dependence of F Tral relaxase DNA specificity. *Nucl. Acids Res.* **34**: 426-435.
- Wiseman, T., S. Williston, J. F. Brandts & L.-N. Lin, (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry* **179**: 131-137.
- Woodbury, R. L., K. A. Klammer, Y. Xiong, T. Bailiff, A. Glennen, J. M. Bartkus, R. Lynfield, C. Van Beneden, B. W. Beall & T. for the Active Bacterial Core Surveillance, (2008) Plasmid-Borne erm(T) from invasive, Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 1140-1143.
- Y**anisch-Perron, C., J. Vieira & J. Messing, (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-109.
- Z**echner, E. L., F. de la Cruz, R. Eisenbrandt, A. M. Grahn, G. Koraimann, E. Lanka, G. Muth, W. Pansegrau, C. M. Thomas, B. M. Wilkins & M. Zaryka, (2000) Conjugative-DNA transfer processes. In: The horizontal gene pool. C. M. Thomas (ed). Amsterdam: Harwood Academic publishers, pp. 87-174.
- Zhai, Z., Y. Hao, S. Yin, C. Luan, L. Zhang, L. Zhao, D. Chen, O. Wang & Y. Luo, (2009) Characterization of a novel rolling-circle replication plasmid pYSI8 from *Lactobacillus sakei* YSI8. *Plasmid* **62**: 30-34.

PUBLICACIONES

LISTA DE PUBLICACIONES ORIGINALES

Esta tesis doctoral ha dado lugar a las dos publicaciones originales enumeradas a continuación. En ambas publicaciones el autor de esta tesis doctoral es el primer autor, siendo el responsable del diseño de los experimentos, el análisis de los resultados y la elaboración de los manuscritos.

1. Lorenzo-Díaz, F. and Espinosa, M. (2009) 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.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848959>
2. Lorenzo-Díaz, F. and Espinosa, M. (2009) Lagging strand DNA replication origins are required for conjugal transfer of the promiscuous plasmid pMV158. *J. Bacteriol.*, **191**, 720–727.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028894>