

717831

FL
3/1117

DNA POLIMERASA DEL BACTERIOFAGO Ø29

Reg F.C.-9691

Tesis presentada para optar
al grado de DOCTOR EN CIENCIAS
por el Licenciado :

LUIS BLANCO DAVILA

Madrid, Abril 1985

Este trabajo, que se presenta como Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, se ha realizado en el Instituto de Biología Molecular (C.S.I.C.-U.A.M.), bajo la dirección de la Profesora Margarita Salas Falgueras, a quien debo mi formación en el campo de la Biología Molecular.

Al Profesor J.M. Sierra, director del Departamento de Virología y Genética Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, agradezco el haber aceptado ser ponente de esta tesis.

A mis compañeros M.A. Peñalva, C. Escarmís, J.M. Hermoso, R.P. Mellado, R. Pastrana, J.L. Carrascosa, I. Prieto, J. Gutiérrez, A. Zaballos, I. Barthelemy y G. Martin agradezco su apoyo y colaboración.

De manera especial quisiera mencionar a J.M. Lázaro y J.A. García, cuyo continuo apoyo científico y moral ha facilitado la realización de este trabajo.

Esta Tesis ha sido realizada gracias a una beca del Plan de Formación de Personal Investigador (Ministerio de Universidades e Investigación), y a una ayuda para la realización de Tesis Doctorales de la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
MATERIALES	
1. Bacterias	21
2. Fagos	21
3. Plásmidos	22
4. Medios de cultivo	22
5. Productos radioactivos	22
6. Determinación de radioactividad	22
7. Cromatografía	23
8. Electroforesis	23
9. Ensayo de actividad "in situ"	23
10. Autorradiografía y fluorografía	23
11. Enzimas y otras proteínas	24
12. Acidos nucleicos y nucleótidos	24
13. Drogas e inhibidores	24
14. Otros productos	24
15. Equipo	25
METODOS	
1. Medios de cultivo	27
2. Valoración de fago	27
3. Preparación de mutantes de ϕ 29 en medio sólido	28
4. Crecimiento de células de <u>B. subtilis</u> e infección	29
5. Preparación de extractos celulares	29
5.1. Preparación de extractos de <u>B. subtilis</u> infectada con ϕ 29	29

5.1.1.	Lisado y precipitación con sulfato amónico : Fracción-S40	30
5.1.2.	Eliminación del DNA de la Fracción I : Fracción DEAE	30
5.1.3.	Extracción de los restos celulares con sal alta : Fracción PEG	31
5.2.	Preparación de extractos de <u>E. coli</u> por lisis mecánica con alúmina	33
5.2.1.	Preparación de extractos conteniendo proteína p3	33
5.2.2.	Preparación de extractos conteniendo proteína p2	33
5.3.	Preparación de extractos por lisis con BRIJ58 ...	35
6.	Preparaciones de DNA	
6.1.	DNA de plásmidos	36
6.2.	DNA del bacteriófago ϕ 29	37
6.3.	Fragmento Hind III B del DNA de ϕ 29	37
6.4.	DNA de ϕ 29 marcado con ^{32}P	37
6.5.	Complejo proteína p3-DNA de ϕ 29	37
7.	Preparación de plásmidos recombinantes conteniendo el gen 2 de ϕ 29.	
7.1.	Preparación del plásmido pBw2	38
7.2.	Preparación del plásmido pLBw2	39
8.	Preparación de células competentes de <u>E. coli</u> y transformación	39
9.	Hibridación a sondas de DNA de ϕ 29 marcado con ^{32}P	40

10.	Análisis de las proteínas sintetizadas en células de <u>E. coli</u> transformadas por el plásmido pLBw2	40
11.	Tinción de proteínas	42
12.	Valoración de proteínas	42
13.	Densitometría	42
14.	Medida de conductividad	42
15.	Medida de radioactividad.	
15.1.	Radioactividad total	43
15.2.	Radioactividad insoluble en ácido tricloroacético.	43
15.3.	Radiación Cerenkov	44
16.	Autorradiografía y Fluorografía	44
17.	Electroforesis.	
17.1.	Electroforesis de proteínas	45
17.1.1.	Preparación de muestras de proteínas para electroforesis	45
17.1.2.	Electroforesis en placas de gel de poliacrilamida	46
17.2.	Electroforesis de DNA	46
17.2.1.	En geles de agarosa	46
17.2.2.	En geles de poliacrilamida	47
18.	Cromatografía.	
18.1.	En columna	47
18.1.1.	Filtración en gel	47
18.1.2.	Intercambio iónico	48
18.1.2.1.	DEAE-celulosa	48
18.1.2.2.	Fosfocelulosa	49
18.1.3.	Afinidad : Azul-Dextrano agarosa (AD-agarosa)	50
18.2.	En capa fina	52

19.	Centrifugación.	
19.1.	Centrifugación analítica de DNA en gradientes alcalinos de sacarosa	52
19.2.	Centrifugación en gradiente de glicerol	53
20.	Ensayos de actividad	
20.1.	Ensayo para la formación del complejo p3-dAMP (Reacción de Iniciación) con extractos de células infectadas (SISTEMA CRUDO)	53
20.2.	Ensayo para la formación del complejo p3-dAMP (Reacción de Iniciación) con extractos de <u>E. coli</u> transformada con plásmidos conteniendo diferentes genes de $\phi 29$	54
20.3.	Ensayo de iniciación "in vitro" (SISTEMA PURIFICADO)	55
20.4.	Ensayo de DNA polimerasa	56
20.5.	Ensayo de DNA polimerasa "in situ"	57
	20.5.1. Electroforesis en gel y renaturalización de proteínas	57
	20.5.2. Ensayo de actividad DNA polimerasa	58
	20.5.3. Análisis del producto marcado con ^{32}P .	59
20.6.	Ensayo de replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de $\phi 29$	59
20.7.	Ensayo de elongación "in vitro" del complejo p3-DNA de $\phi 29$	60
20.8.	Ensayo de actividad exonucleasa	61
21.	Análisis de restricción del DNA de $\phi 29$ sintetizado "de novo"	62

RESULTADOS

1. Factores implicados en la iniciación de la replicación del DNA de Ø29 (SISTEMA CRUDO)	63
1.1. Requerimiento de los productos de los genes 2 y 3 virales en la formación "in vitro" del complejo p3-dAMP	64
1.2. Efecto de mutaciones en los genes 5,6 y 17 virales sobre la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP	68
1.3. Efecto de inhibidores de la replicación, transcripción y traducción sobre la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP	71
1.4. Requerimiento de ATP en la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP	72
2. Clonaje y expresión del gen 2 del bacteriófago Ø29	73
2.1. Aislamiento y caracterización de recombinantes ..	73
2.2. Síntesis de proteínas dirigida por el plásmido recombinante pLBw2	75
2.3. Estabilidad de las proteínas inducidas en <u>E.coli</u> transformada con el plásmido recombinante pLBw2 .	77
2.4. Formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP con proteína p2 sintetizada en <u>E. coli</u> ..	78
3. Purificación y caracterización de la proteína p2 como una DNA polimerasa	80
3.1. Actividad DNA polimerasa asociada a la proteína p2	81

3.2.	Ensayo de renaturalización "in situ" : la DNA polimerasa es una proteína de 68.000 daltons	85
3.3.	Purificación de la proteína p2	87
3.4.	Requerimientos de la DNA polimerasa de ϕ 29	96
4.	Replicación "in vitro" del DNA de ϕ 29 (SISTEMA PURIFICADO)	97
4.1.	Iniciación de la replicación	99
4.1.1.	Formación "in vitro del complejo p3-dAMP con proteína p2 purificada. Requerimiento de un factor(es) celular	99
4.1.2.	Naturaleza proteica del factor(es) celular.	101
4.2.	Elongación "in vitro" del DNA de ϕ 29	102
4.2.1.	Complejo p3-DNA de ϕ 29 como molde para la actividad DNA polimerasa de la proteína p2: Requerimiento de la proteína terminal p3	102
4.2.2.	Elongación del complejo de iniciación p3-dAMP por la DNA polimerasa de ϕ 29	104
4.2.2.1.	Especificidad del producto elongado en presencia de un terminador de cadena	104
4.2.2.2.	Análisis de restricción del material elongado por la DNA polimerasa de ϕ 29	105
4.2.2.3.	Papel del factor(es) celular en la elongación del DNA de ϕ 29.	107
4.2.2.4.	Origen y dirección de la síntesis de DNA	108

4.3.	Síntesis "in vitro" de DNA de Ø29 de tamaño unidad	109
4.4.	Requerimiento para la replicación "in vitro" del DNA de Ø29. Estimulación por iones NH_4^+	111
4.5.	Efecto del sulfato amónico	112
4.5.1.	Sobre la formación del complejo p3-dAMP .	112
4.5.2.	Sobre las cinéticas de iniciación y replicación del DNA de Ø29	113
4.5.3.	Sobre la elongación "in vitro" del DNA de Ø29	114
4.6.	Papel del ATP en la replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de Ø29	116
4.6.1.	Efecto del ATP sobre la formación del complejo p3-dAMP	117
4.6.2.	Efecto del ATP sobre la elongación del complejo p3-dAMP	117
4.7.	Efecto de las drogas Aphidicolina y BuAdATP sobre la replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de Ø29	118
5.	Actividad exonucleasa de la proteína p2	120
5.1.	Actividad exonucleasa 3' → 5' sobre DNA de cadena sencilla	121
5.2.	Caracterización del material hidrolizado como deoximononucleótidos	122
5.3.	Asociación de las actividades de replicación y exonucleasa 3' → 5' de la DNA polimerasa de Ø29	124

5.3.1. Coinactivación térmica	124
5.3.2. Cosedimentación en gradiente de glicerol ..	125
5.4. Efecto de las drogas Aphidicolina y BuAdATP sobre la actividad exonucleasa 3' → 5' de la proteína p2	126
5.5. Requerimientos y magnitud de la actividad exonu- cleasa 3' → 5' de la DNA polimerasa de Ø29	127
DISCUSION	129
CONCLUSION	168
BIBLIOGRAFIA	171

ABREVIATURAS

AD-agarosa : azul dextrano-agarosa.

ADP : adenosina 5'-difosfato.

AMP-PCP : β , γ -metilenadenosina 5'-trifosfato.

AMP-PNP : β , γ -imidoadenosina 5'-trifosfato.

Ap₄A : diadenosina tetrafosfato.

BuAdATP : N²-(p-n-butilanilino)dATP.

cpm : cuentas por minuto.

DNA : ácido desoxirribonucleico.

{3'-³²P}-DNA : DNA marcado con ³²P en el extremo 3'.

{5'-³²P}-DNA : DNA marcado con ³²P en el extremo 5'.

DNasa : deoxirribonucleasa.

DEAE-celulosa : dietil-aminoetil-celulosa.

DTT : ditioneitol.

EDTA : ácido etilendiamino tetracético.

g : aceleración de la gravedad.

HPUra : 6-(p-hidroxifenilazo)-uracilo.

IgG : inmunoglobulina G.

mdi : multiplicidad de infección.

NMP : ribonucleósido 5'-monofosfato.

NTP : ribonucleósido 5'-trifosfato.

dNMP : 2'-deoxirribonucleósido 5'-monofosfato.

dNTP : 2'-deoxirribonucleósido 5'-trifosfato.

PEI-celulosa : polietilenimina-celulosa.

PEG : polietilenglicol.

PPO : 2,5-difenil-oxazol.

Dimetil-POPOP : 1,4-bis{2(4-metil-5 fenil-oxazolil)} benceno.

PSA : persulfato amónico.

RNA : ácido ribonucléico.

t-RNA : ácido ribonucléico de transferencia.

RNAsa : ribonucleasa.

rpm : revoluciones por minuto.

sus : sensible a supresor.

SAB : seroalbúmina bovina.

SDS : dodecil sulfato sódico.

TEMED : tetrametiletildiamina.

ts : sensible a temperatura.

Tris : trihidroximetilaminometano.

ufp : unidades formadoras de placa.

"DNA polymerases are found in
nature wherever DNA is made"

Arthur Kornberg

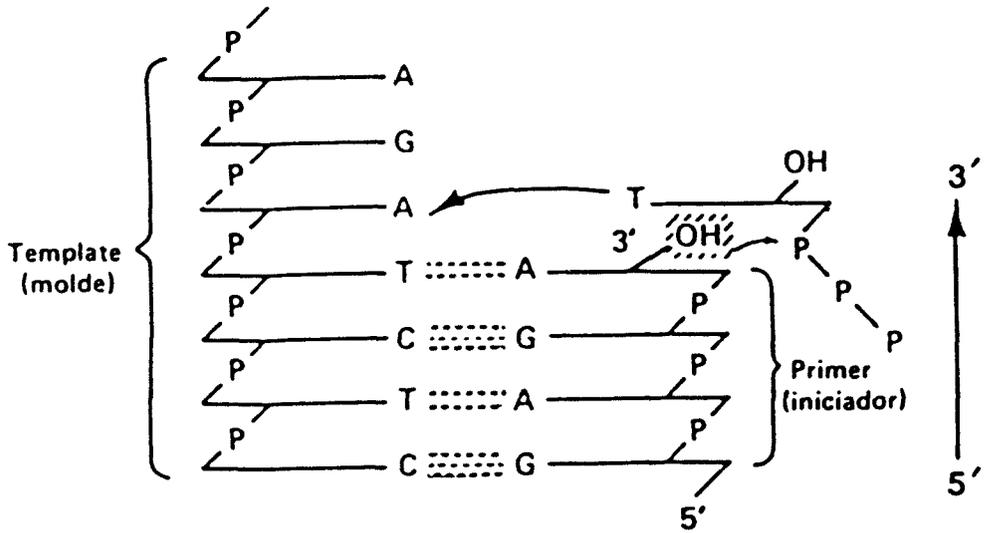
I N T R O D U C C I O N

El modelo estructural propuesto por Watson y Crick en 1953 (1) postulaba que cada una de las cadenas de DNA serviría de molde para la formación de las cadenas hijas; de esta manera se solucionaba teóricamente una de las características esenciales del material hereditario : su transmisión invariable de generación en generación. A nivel práctico, la enzimología de este proceso, aparentemente sencillo, supone la existencia de un alto grado de especialización que permita un fiel seguimiento de las instrucciones del molde.

Los enzimas que son capaces de sintetizar nuevas cadenas de DNA siguiendo las instrucciones de una cadena molde reciben el nombre de DNA polimerasas. Generalmente, tanto las células eucarióticas como procarionóticas poseen más de una actividad DNA polimerasa distinta, si bien es un enzima particular, en cada caso, el que realiza la actividad de replicación, mientras que los otros desempeñan papeles auxiliares ó bien participan en la reparación de lesiones producidas en el DNA. En cualquier caso, la actividad DNA polimerasa sigue unas reglas básicas (ver Esquema 1), que permiten hacer una serie de generalizaciones (2) :

- 1) La síntesis es dirigida por una cadena molde de DNA. Esta cadena puede ser RNA en el caso de tratarse de DNA polimerasas RNA-dependientes.

Esquema 1



2) Se requiere un iniciador o "primer" que proporcione un grupo 3'-OH a partir del cual tiene lugar la polimerización; de otra forma no puede iniciarse la síntesis. Este "primer" suele ser una cadena nucleotídica (DNA o RNA) apareada a la cadena molde, pero en algunos casos, como veremos más adelante, puede presentar distinta naturaleza.

3) Se requieren dNTPs, que activados en presencia de Mg^{+2} , serán los precursores de la cadena naciente.

4) La reacción de polimerización comienza con la formación de un enlace fosfoéster debido al ataque nucleofílico del grupo 3'-OH suministrado por el "primer" sobre el átomo de fósforo en "α" del dNTP activado,

con la eliminación de su pirofosfato terminal. Este nucleótido, recién incorporado, proporciona nuevamente el extremo 3'-OH necesario para que la reacción continúe. De esta manera, el crecimiento total de la cadena es en dirección 5' → 3'. La polaridad de la cadena de nueva síntesis es, por tanto, opuesta a la del molde.

5) Se requiere un correcto apareamiento entre las bases correspondientes al nucleótido "naciente" y al molde, antes de que ocurra la reacción de polimerización. Si no se ha formado la pareja de bases correcta, el enzima rechaza el nucleótido mal apareado. Esta selección por apareamiento de Watson y Crick, durante el proceso de polimerización permite ejecutar correctamente las instrucciones del molde (teóricamente, el error intrínseco en el apareamiento es del orden de 10^{-3} (3)).

En el caso de las DNA polimerasas de organismos procarióticos, el enzima puede comprobar también la precisión de apareamiento de las bases entre el extremo del "primer" y el molde : si las bases no están apareadas no tendrá lugar la subsiguiente polimerización. Por el contrario, el nucleótido apareado erróneamente será eliminado gracias a una función de estas DNA polimerasas denominada exonucleasa 3' → 5' (4). Su actividad degrada los nucleótidos mal apareados, a partir del extremo 3' de la cadena y en dirección opuesta a la

síntesis de DNA. Cuando se logra una estructura dúplex correctamente apareada puede tener lugar la polimerización. De esta manera queda asegurada una gran fidelidad en la replicación, puesto que mediante este mecanismo de autocorrección, el error de polimerización sería del orden de 10^{-6} , que se ajusta perfectamente a la frecuencia de errores observada en la replicación del cromosoma de E. coli (5).

La ausencia de esta actividad "correctora de pruebas" en las DNA polimerasas eucarióticas implica que deben tener algún otro mecanismo para controlar la fidelidad de la replicación.

Probablemente la posesión de una actividad de autocorrección de errores, basada en la discriminación del extremo 3'-OH como "apareado" o "desapareado", es la causa indirecta de que las DNA polimerasas no puedan iniciar por sí mismas una cadena de DNA, ya que este proceso "corrector de pruebas" ocurre previamente al siguiente paso de polimerización. Por el contrario, si estas enzimas fuesen capaces de iniciar "de novo" cadenas de DNA, tendría que existir un mecanismo diferente que asegurase la fidelidad de copia hasta reducir a aceptable la tasa de mutación (6).

Por tanto, esta importante aunque necesaria limitación en las propiedades de la DNA polimerasa, planteaba las siguientes preguntas : ¿Quién proporciona las estructuras "primer"?, ¿Cuál es su naturaleza?,

¿Se sintetizan "ah hoc" o son preexistentes?, ¿Permanecen o son degradadas posteriormente?.

Una de las alternativas consideradas fué que toda síntesis de DNA tenía lugar mediante elongación de cadenas de DNA preexistentes en las que se ha generado un extremo 3'-OH libre, y por tanto un "primer", por medio de una rotura endonucleolítica. Aunque no de una forma general, esta posibilidad constituye el mecanismo de iniciar la síntesis en algunos fagos DNA en los que la replicación progresa por el sistema de círculos rodantes (2). Otra alternativa es la que implica en el proceso a una RNA polimerasa. Este enzima, debido quizás a que la tasa de error tolerable durante la transcripción es mucho mayor que en la replicación, no requiere la existencia de un "primer", y por tanto, puede iniciar la síntesis de una cadena de RNA (7). De este modo, una corta acción transcripcional de la RNA polimerasa podría proporcionar un RNA "primer" para la replicación del DNA.

Otro mecanismo adicional para solucionar el problema de la iniciación de la cadena de DNA es el utilizado por los Parvovirus. Estos virus contienen un genoma de DNA de cadena sencilla, con secuencias palindrómicas en ambos extremos; esta homología de secuencia permite la formación de zonas de banda doble, llamadas "hairpins", que posibilitan la iniciación de la síntesis de DNA por

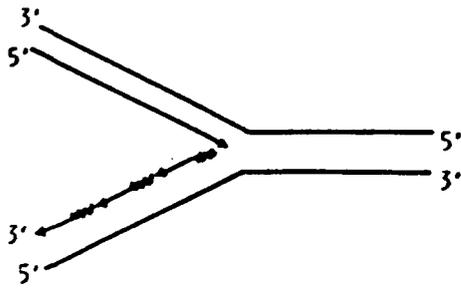
una DNA polimerasa. De esta manera, el "hairpin" formado en el extremo 3' funciona como un "primer natural", que en este caso es DNA, a partir del cual se produce la elongación y posterior replicación del genoma viral, catalizada probablemente por la DNA polimerasa " α " eucariótica (8).

En el caso de los Retrovirus, la iniciación de la síntesis de DNA dependiente de RNA es realizada por la transcriptasa inversa (DNA polimerasa RNA-dependiente) a partir de un t-RNA específico que actúa como "primer" por apareamiento parcial con el genoma viral (9).

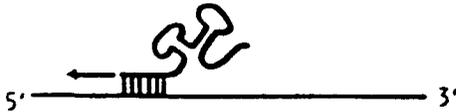
Como otro ejemplo de la diferente naturaleza de estructuras que pueden funcionar como "primer", el dinucleótido Ap₄A, cuyo nivel se incrementa dramáticamente en tejidos en activa proliferación (10) y que es capaz de unirse específicamente a una de las subunidades del complejo de alto peso molecular de la DNA polimerasa α (11), puede actuar como "primer" por unión a una región complementaria de la cadena de DNA (12).

En la Figura 1 se muestra un esquema del funcionamiento de los diferentes tipos de "primer" descritos anteriormente.

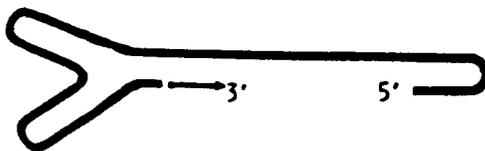
Actualmente se sabe que el mecanismo de iniciación de la síntesis de DNA más extendido, tanto en los organismos eucarióticos como en los procarióticos, se basa en la síntesis de cortas secuencias de RNA originadas por



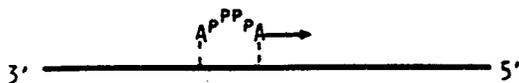
FRAGMENTOS DE OKAZAKI ("PRIMADOS" POR RNA)



RETROVIRUS



PARVOVIRUS



AppppA

Figura 1. Iniciación de la síntesis de DNA : naturaleza de diferentes estructuras "primer". El tipo de estructura "primer" más generalizado consiste en pequeños fragmentos de RNA (\cong 10 nucleótidos), si bien su naturaleza puede variar. Así, por ejemplo, los retrovirus utilizan un t-RNA especial como "primer", los parvovirus utilizan un "hairpin" formado en el extremo 3' del DNA, y en otros casos se puede utilizar un dinucleótido como el Ap₄A.

una clase especial de RNA polimerasas denominadas DNA primasas (2). Así, la implicación de RNA como "primer" en la iniciación de la cadena de DNA es muy clara en casos como la conversión de la cadena simple a forma replicativa en M13 (13) y ϕ X174 (14), la replicación del plásmido Col E1 (15-17), la síntesis de fragmentos nacientes de replicación en T7 (18), T4 (19,20), E. coli (21,22) y células tumorales y linfocitos (23,24), la replicación del DNA de polioma en núcleos de células animales (25), mientras que en muchos otros casos existen evidencias indirectas.

En muchas ocasiones se sintetiza un sólo "primer" de RNA que es elongado continuamente por la DNA polimerasa. Este fragmento de RNA puede más tarde ser reconocido y eliminado por una acción nucleolítica. En otras ocasiones se precisa la síntesis de multitud de estos "primers", que al ser elongados por la DNA polimerasa originan una síntesis discontinua de fragmentos de DNA llamados fragmentos de Okazaki (26). Estos fragmentos, previa degradación de los RNA "primer", son posteriormente elongados y ligados entre sí para constituir la molécula continua de DNA naciente. Sin embargo, y como se esquematiza en la Figura 2, el sistema de iniciación con RNA presenta un grave problema en el caso de aplicarse a genomas lineales puesto que, después de la degradación del RNA iniciador, e independientemente de que la síntesis de DNA sea continua o discontinua, quedará un

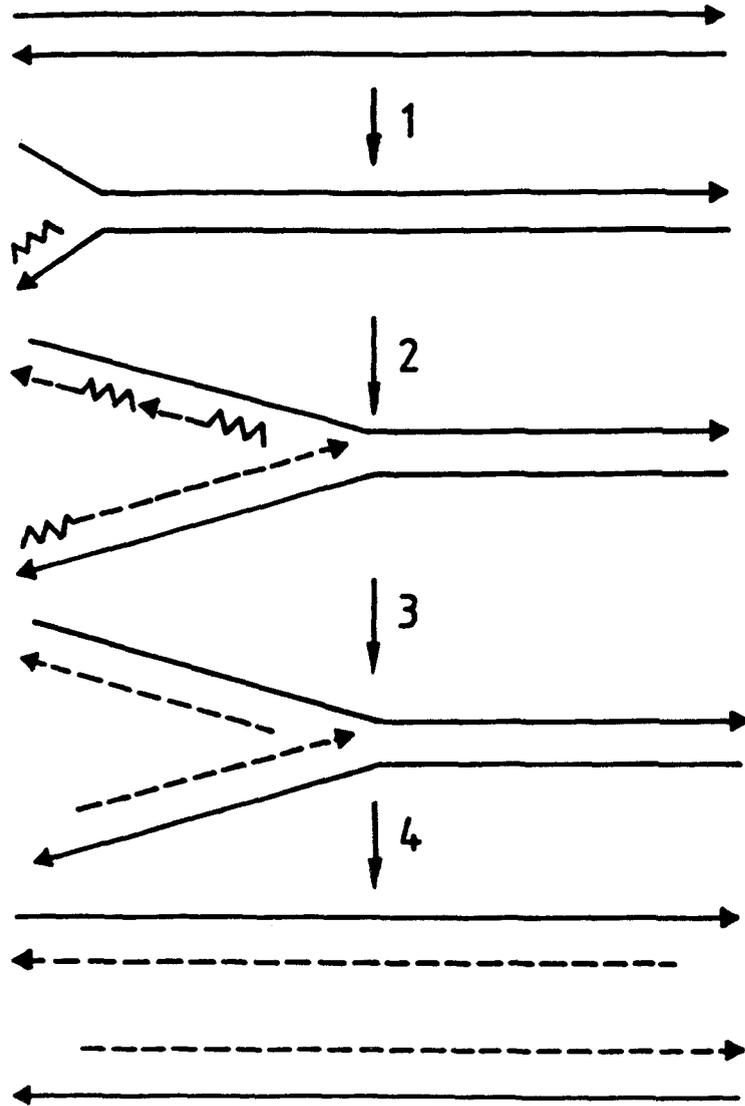


Figura 2. El problema de la iniciación de la síntesis de DNA por RNA en un genoma lineal. Las líneas quebradas representan el iniciador de RNA y las líneas discontinuas el DNA recién sintetizado. 1) Iniciación por RNA en una de las bandas (adelantada). 2) Síntesis continua de DNA en la banda adelantada y síntesis discontinua de DNA, iniciada por RNA, en la banda retrasada. 3) Degradación del RNA iniciador, relleno de los huecos y ligamiento de los fragmentos. 4) Continuación del proceso hasta la producción de 2 moléculas de DNA hijas, ambas con un hueco en el extremo 5' de la cadena replicada, imposible de rellenar por la DNA polimerasa.

hueco en el extremo 5' de cada cadena replicada, en posición opuesta a los extremos 3' de las cadenas paternas que actuaron de molde. Ninguno de los modos de acción de los enzimas conocidos podrían fácilmente dar cuenta de cómo pueden rellenarse los huecos de estas regiones terminales. Es decir, si la iniciación de la replicación del DNA en las regiones opuestas a los extremos 3' de la cadena molde, necesita RNA como "primer", el reemplazamiento de los fragmentos de RNA por DNA sería imposible (por no existir los extremos 3'-OH libres necesario para la DNA polimerasa), salvo en el caso de un crecimiento de la cadena en dirección 3' \rightarrow 5', y no se conoce ninguna DNA polimerasa que actúe en esta dirección (2).

Se han propuesto distintas soluciones para acomodar la necesidad de copiar un extremo de DNA; una de ellas supone la implicación de estructuras de DNA como por ejemplo, la creación de un "hairpin" por existencia de regiones palindrómicas en un extremo del DNA (8); este parece ser el mecanismo utilizado en el caso de los Parvovirus (ver Figura 1), y para la replicación del DNA lineal mitocondrial de Paramecium (27). En otros casos se han propuesto modelos que, haciendo uso de la existencia de repeticiones terminales invertidas o mediante extremos cohesivos, solucionan el problema por formación de concatémeros (28) o moléculas circulares (29,30) como intermediarios de la replicación.

Otra posible solución se propuso a partir del descubrimiento de proteínas unidas covalentemente a los extremos 5' de los genomas de varios virus (31). La caracterización de estas proteínas así como su implicación en la iniciación de la síntesis de DNA han sido sucesos relativamente recientes por lo que se describen con detalle a continuación.

La primera indicación de la existencia de estas proteínas data de 1971, y se obtuvo a partir de estudios realizados con el DNA del bacteriófago $\phi 29$ (32). La cápsida de este virus, que es un fago de B. subtilis, posee una molécula de DNA lineal bicatenario de 18 Kpb que presenta unida covalentemente a ambos extremos 5', una proteína viral (p3) que se ha identificado como el producto del gen 3 (33). La Figura 3 muestra una micrografía electrónica del complejo proteína p3-DNA de $\phi 29$.

El hallazgo de este tipo de proteínas no se ha limitado a $\phi 29$, sino que se han encontrado proteínas unidas covalentemente a ácidos nucleicos en otros virus DNA como adenovirus (34), el virus de la hepatitis B (35) y otros fagos relacionados con $\phi 29$, como $\phi 15$, M2, Nf y GA-1 (36), así como en virus RNA, tanto animales como el virus de la poliomielitis (37,38), el virus de la encefalomiocarditis (39,40), el virus de la glosopeda (41) y el virus del exantema vesicular (42), como vegetales, en el caso del virus del mosaico del frijol

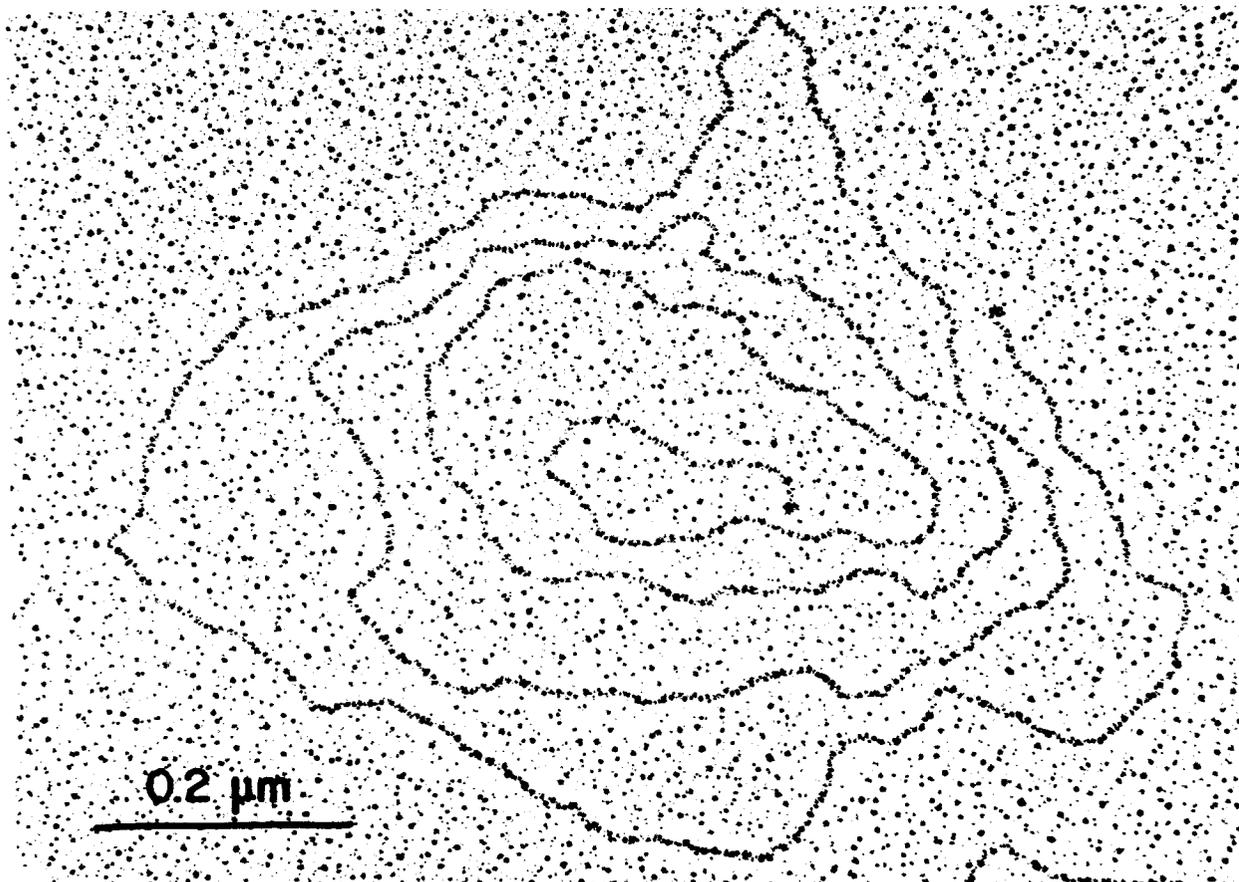


Figura 3. Micrografía electrónica del complejo p3-DNA de $\varnothing 29$ (realizada por J.M. Sogo).

vacuno (43) y el virus de la mancha anillada del tabaco (44). Recientemente se han encontrado este tipo de proteínas en el plásmido lineal pSLA2 de *Streptomyces* (45), en el DNA mitocondrial S1 y S2 del maiz (46), en el fago PRD1 de *Salmonella typhimurium* (47) y en el fago Cp1 de *Streptotoccus pneumoniae* (48).

De todos estos ejemplos, los más estudiados han sido ϕ 29 y adenovirus, y como veremos a continuación, los datos obtenidos en ambos casos presentan una gran coincidencia debido probablemente a que poseen un mecanismo de replicación muy similar.

Las moléculas de proteína p3 presentes en los extremos 5' del DNA de ϕ 29 interaccionan entre sí, dando lugar a la formación de moléculas circulares y concatémeros (32,33) los cuales, después de tratamiento con enzimas proteolíticos se convierten en DNA lineal de tamaño unidad. El DNA de adenovirus, que también tiene una proteína unida covalentemente a los extremos 5' (49,50), da lugar al mismo tipo de moléculas circulares y concatémeros (34,51). Hasta el momento permanece sin aclarar si este tipo de circularización en los DNAs de ϕ 29 y adenovirus tiene algún significado biológico. Recientemente, en células infectadas con Adenovirus tipo 5, se han detectado estructuras resultantes de la unión covalente (cabezas-colas) de moléculas de DNA viral, las cuales se deben en parte a la formación de

circulos cerrados covalentemente (52). También en este caso permanece sin aclarar el posible papel de estas estructuras en algún proceso de replicación o transformación.

En ambos virus se ha estudiado la naturaleza de la unión entre la proteína terminal y el DNA, demostrándose la existencia de un enlace covalente fosfoéster entre el grupo hidroxilo de un residuo de serina en la proteína terminal y 5'-dAMP en el caso de Ø29 (53) ó 5'-dCMP en el caso de adenovirus (54). Estos nucleótidos resultaron ser los nucleótidos terminales en los extremos 5' del DNA. La secuenciación de ambos extremos del DNA reveló, además, la existencia de repeticiones terminales invertidas de 6 nucleótidos, en el caso de Ø29 (55,56) y de aproximadamente 100 nucleótidos en el caso de adenovirus (57), así como la existencia de repeticiones internas. Por otra parte, el estudio por microscopía electrónica de los intermediarios replicativos producidos "in vivo" permitió concluir que la iniciación en Ø29 (58,59) y adenovirus (60,61) se produce en, o muy cerca, de los extremos, de manera no simultánea, y que la replicación progresa por un mecanismo de desplazamiento de banda.

Puesto que en ambos casos, la replicación del DNA no parecía ocurrir a través de estructuras circulares o concatémeros, y la secuencia en los extremos era incompatible con la formación de un "hairpin" que permitiese

la iniciación de la replicación del DNA, los datos anteriores unidos al hecho de que estas proteínas terminales se sintetizaban a tiempos tempranos de la infección y eran esenciales para la replicación del DNA viral (62,63), permitieron postular un papel de estas proteínas como "primers" en la iniciación de la replicación del DNA de ϕ 29 y adenovirus.

Este modelo de iniciación (ver Figura 4) propuesto por Rekosh y col. (49) para el caso de adenovirus, y que fué propuesto también para la replicación del DNA de ϕ 29 (58,59), sugiere que una molécula sintetizada "de novo" de proteína terminal interacciona con la proteína terminal paterna unida al DNA, con la repetición terminal invertida, o con ambas, y "prima" la replicación por reacción con el dNTP 5'-terminal, dando lugar a la formación de un complejo covalente proteína-dNMP, que ya proporciona el grupo 3'-OH libre necesario para la elongación por la DNA polimerasa. De acuerdo con este modelo, tanto en el caso de ϕ 29 (64) como en el caso de adenovirus (65) se han encontrado intermedios replicativos con proteína terminal asociada a los extremos 5', tanto de las cadenas hijas como de las paternas.

Si bien el significado biológico de la existencia de las repeticiones terminales invertidas en los DNA de ϕ 29 y adenovirus todavía está por aclarar, es probable que su función sea la de constituir secuencias de reco-

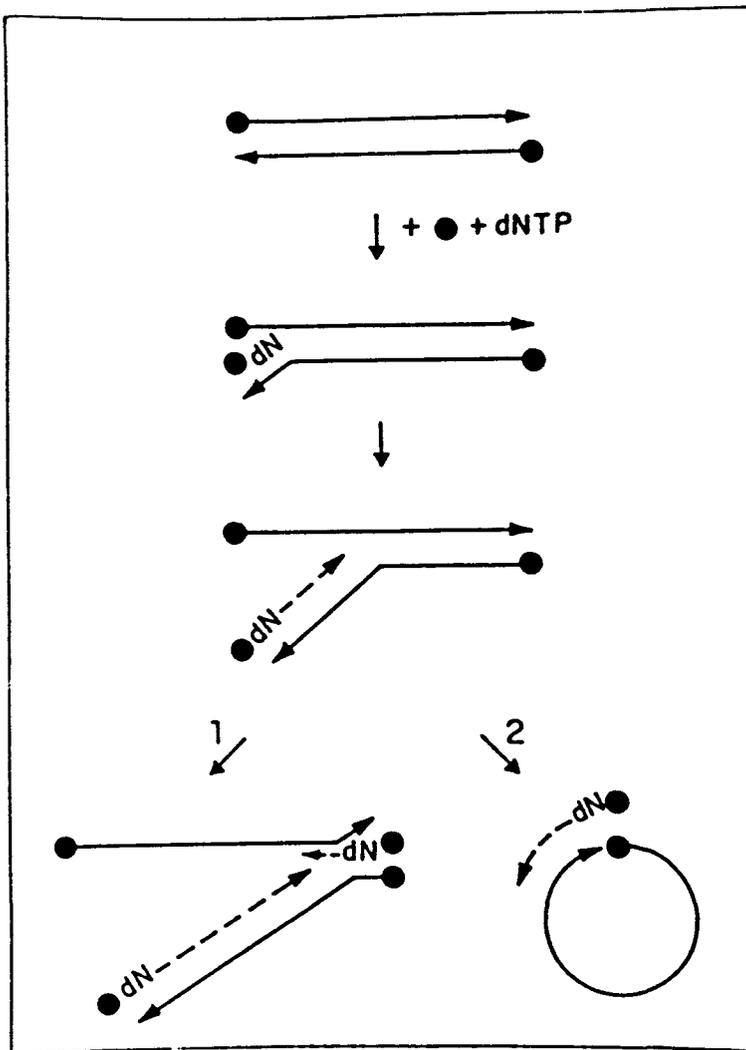


Figura 4. Modelo de la implicación de las proteínas terminales en la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$ y adenovirus. Este modelo está adaptado de los propuestos por Rekosh y col. (49) e Inciarte y col. (58). Los puntos negros representan la proteína terminal. Las líneas continuas representan el DNA paterno y las discontinuas el DNA sintetizado "de novo". La proteína terminal libre interacciona con la proteína terminal paterna y/o la secuencia terminal, uniéndose covalentemente al nucleótido 5'-terminal. El complejo proteína-dNMP así formado, suministra el extremo 3'-OH necesario para elongar la cadena. La iniciación correspondiente a la banda que está siendo desplazada puede producirse

antes de que esto ocurra totalmente (1) ó bien la iniciación de la síntesis del DNA en la banda completamente desplazada ha de suponer un mecanismo que implique circularización y/o reconocimiento de la secuencia nucleotídica en el extremo 3' por la proteína terminal que actúa de "primer" (2).

nocimiento para proteínas implicadas en la iniciación de la replicación. Por otra parte, aunque no hay homologías entre las secuencias de los extremos del DNA de ambos virus, sí existe una característica común entre la repetición terminal invertida del DNA de Ø29 y los 14 pares de bases más extremos del DNA de diferentes adenovirus : son muy ricos en pares A-T. Este tipo de regiones ricas en pares A-T suele estar presente en varios orígenes de replicación secuenciados, y parece que la existencia de estas regiones es importante en aquellas zonas del DNA donde se requiere una apertura local de las cadenas. Las secuencias de los extremos de otros fagos de B. subtilis relacionados con Ø29, tales como Ø15, M2Y, NF y GA-1 han sido determinadas (56), observándose la existencia de repeticiones terminales invertidas, que en el caso de Ø15 es AAAGTA, idéntica a la de Ø29, en el caso de M2Y y Nf es AAAGTAAG y en el caso de GA-1 es AAATAGA, siendo en todos los casos de composición muy rica en pares A-T. También es interesante resaltar que el fago Cp-1 de Streptococcus pneumoniae, que también tiene una proteína unida covalentemente a los extremos 5' de su DNA (48), presenta una secuencia terminal (AAAGCA) muy similar a la del DNA de Ø29, aunque en su caso la longitud de la repetición terminal invertida es de 236 pares de bases (66), incluso mayor que en el caso del DNA de adenovirus. En el caso

de adenovirus se ha postulado que la función de su larga repetición terminal invertida es la de circularización, por autoapareamiento, de bandas simples totalmente desplazadas (ver Figura 4), que serían replicadas en forma circular (60).

En contraste con la replicación de genomas eucarióticos, los cuales presentan muchos puntos de origen en posiciones distantes a lo largo del DNA, la replicación del DNA de bacterias y virus comienza, por regla general, en un único punto de la molécula. Por tanto, el mecanismo propuesto para la replicación de genomas conteniendo proteínas terminales sería una excepción en cuanto a que utiliza 2 orígenes de replicación, localizados en ambos extremos de su molécula. De esta manera no sería necesaria la síntesis discontinua en ninguna de las dos bandas, si bien de momento no hay datos que descarten o apoyen la posibilidad de que la replicación se realice mediante fragmentos.

De todas maneras, aunque todas las evidencias obtenidas "in vivo" son consistentes con el modelo propuesto para la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$, fué importante desarrollar un sistema de replicación "in vitro" que lo apoyase directamente. En este sentido, se obtuvieron los resultados que se detallan a continuación. Cuando se incubaron extractos de B. subtilis infectada con $\phi 29$ en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{-dATP}$ y Mg^{2+} ,

se detectó la aparición de una banda marcada, con la movilidad electroforética de la proteína p3. El producto de esta reacción fué insensible al tratamiento con nucleasa de micrococo, RNasa y fosfatasa alcalina, pero sensible al tratamiento con proteinasa K. Cuando se incubó este producto, marcado "in vitro" con ^{32}P , con piperidina en las condiciones en las que se hidrolizaba el enlace fosfoéster entre la proteína p3 y el DNA de $\phi 29$, se produjo la liberación de 5'-dAMP. Además, esta reacción con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP fué inhibida fuertemente por suero anti-p3. Cuando se comparó la hidrólisis parcial con la proteasa V8 del material marcado con ^{32}P "in vitro" respecto a la de la proteína terminal p3 marcada con ^{35}S , se observó la producción de un péptido común, con la misma movilidad electroforética en geles de poli-acrilamida-SDS. Todos estos resultados demostraron la formación "in vitro" de un complejo entre la proteína terminal p3 y 5'-dAMP (67).

Por otra parte, la eliminación del DNA de los extractos originaba la pérdida de la actividad formadora del complejo p3-dAMP. Esta actividad se recuperaba por adición de complejo p3-DNA de $\phi 29$ aislado de viriones, pero no por adición de DNA de $\phi 29$ desproteínizado por tratamiento con proteinasa K (67), lo cual indicaba un importante papel de la proteína p3 unida al DNA, en la formación del complejo p3-dAMP. También se demostró con este sistema "in vitro" que la formación del complejo

p3-dAMP constituía realmente el primer paso en la replicación del DNA de Ø29, puesto que pudo ser elongado por adición del resto de los dNTPs. Cuando, teniendo en cuenta la secuencia nucleotídica de ambos extremos del DNA, se utilizó dideoxi-CTP para detener la elongación en los nucleótidos 9 y 12 a partir de los extremos izquierdo y derecho, respectivamente, se detectó la aparición de una nueva banda marcada, de mayor peso molecular que el complejo p3-dAMP, que por hidrólisis alcalina liberó los oligonucleótidos de 9 y 12 bases esperados (67).

Por tanto, los resultados obtenidos con este sistema "in vitro" de iniciación, confirmando el modelo propuesto para la replicación del DNA de Ø29, demostraron la función de la proteína terminal, p3, en la iniciación de las cadenas nacientes de DNA.

Paralelamente al caso de Ø29, el desarrollo de un sistema "in vitro" de iniciación de la replicación del DNA de adenovirus, permitió demostrar la formación de un complejo entre el precursor de la proteína terminal pTP y 5'-dCMP (68,69); este precursor es una proteína de 80.000 daltons que después de incorporarse a la cadena naciente, es procesada por una proteína codificada por un gen viral en el que se dispone de mutantes sensibles a temperatura (70,71), originando la proteína de 50.000 daltons que se encuentra unida covalentemente al DNA de adenovirus aislado a partir de viriones.

Otros resultados que apoyan fuertemente el papel de la proteína p3 en la replicación del DNA de Ø29, se obtuvieron a partir de estudios realizados "in vivo" con diferentes mutantes de Ø29 en genes implicados en la síntesis del DNA viral. Los mutantes de enzimas implicados en procesos tan vitales como la replicación del DNA, cuyo producto final no puede suministrarse al medio, tienen que ser necesariamente mutantes letales condicionales, es decir, el mutante condicional debe poder sintetizar una proteína que permita la replicación del DNA en condiciones "permissivas" pero que sea deficiente en esta proteína en condiciones restrictivas (2). Un ejemplo de mutantes de este tipo son aquellos que son capaces de replicar el DNA a 30°C, pero no a 42°C. Estos mutantes, denominados ts, se pueden clasificar en dos grupos principales, aquellos en los que un cambio a las condiciones restrictivas (42°C) origina una parada o enlentecimiento de la síntesis de DNA, lo cual indica que están afectados en un gen necesario para la elongación o maduración de esta síntesis (mutantes en elongación), y aquellos en los que la síntesis se mantiene durante una ronda completa de replicación y luego se para, lo cual sugiere su implicación en la iniciación de la síntesis de DNA (mutantes de iniciación). Los genes de Ø29 que están implicados en la síntesis del DNA viral son los genes 2, 3, 5, 6 y 17 (62,63). Los experimentos

de elevación de temperatura (experimentos "shift-up") realizados con mutantes ts en los genes 2, 3, 5 y 6 indicaron la implicación de los genes 2 y 3 en un paso de iniciación de la replicación de DNA de $\phi 29$, y la de los genes 5 y 6 en un paso de maduración o elongación (72). Por tanto, el resultado obtenido con el mutante ts 3, que implicaba a la proteína p3 en un paso de iniciación, era consistente con el modelo propuesto para la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$. Por otro lado, el análisis genético de la descendencia obtenida en un experimento de infección mixta, a temperatura restrictiva, con los mutantes ts 2 y ts 3 de $\phi 29$, ambos implicados en la iniciación "in vivo", dió como resultado que los genomas del mutante ts 3, que llevaban una proteína p3 termosensible, no se replicaban (33), mientras que la infección mixta con mutantes sus en los mismos cistrones daba lugar a descendencia sus 2 y sus 3 en cantidades equivalentes. Estos resultados estaban de acuerdo con el modelo propuesto en el cual se adjudicaba un papel importante a la proteína paterna en el reconocimiento del lugar en el que debería colocarse la proteína p3 libre para iniciar la replicación. Sin embargo, una explicación alternativa podría ser que la proteína paterna sea la que inicia la replicación en la banda hija. Por tanto,

una de las cuestiones que quedaba sin aclarar era si el complejo p3-dAMP, detectado "in vitro" se formaba a partir de la proteína p3 paterna o bien a partir de una molécula de proteína p3 de nueva síntesis.

Se ha descrito que el producto del gen 2 está implicado en la unión del DNA viral a la membrana de la célula huésped (100). Por tanto, éste podría ser el papel de este producto génico en la iniciación de la replicación del DNA de Ø29, lo cual estaría de acuerdo con los resultados "in vivo" mencionados anteriormente. Teniendo en cuenta esta posibilidad, otra cuestión importante a resolver era si el producto del gen 2 estaba o no implicado directamente en la formación del complejo p3-dAMP. El hecho de que no haya sido descrita una unión covalente proteína-DNA en bacterias, sugiere que la formación del complejo p3-dAMP, o bien ocurre autocatalíticamente, o ha de implicar a algún otro producto génico codificado por el virus. En este sentido, los experimentos "shift up" realizados con mutantes ts no permiten excluir la posibilidad de que aquellos genes a los que se les ha asignado un papel en la elongación del DNA, estén implicados también en procesos de iniciación.

Por tanto, un sistema "in vitro" dependiente de complejo p3-DNA exógeno que permita ensayar la formación del complejo de iniciación p3-dAMP, que es el primer paso en la replicación del DNA de Ø29, sería el sistema

ideal para estudiar qué proteínas, virales o celulares, están implicadas en esta reacción. Así, la disponibilidad de este sistema de ensayo "in vitro", y la de una colección de mutantes de Ø29, tanto sus como ts, en diferentes cistrones necesarios para la síntesis del DNA viral, nos ha permitido estudiar (independientemente) la implicación de cada uno de estos productos génicos en la formación del complejo p3-dAMP.

En este trabajo se demuestra que la formación "in vitro" del complejo p3-dAMP requiere únicamente la presencia de los productos de los genes 2 y 3 virales, si bien esta reacción es fuertemente estimulada por algún factor(es) proteico celular. La proteína p2, expresada eficientemente en E. coli transformada con un plásmido recombinante conteniendo el gen 2 de Ø29, ha sido purificada y caracterizada como una DNA polimerasa que, además de intervenir en la formación "in vitro" del complejo p3-dAMP, es capaz de elongarlo hasta replicar completamente el DNA viral. Por tanto, esta nueva DNA polimerasa, que posee asociada una actividad exonucleasa 3' → 5', podría ser la única DNA polimerasa implicada en la replicación del DNA de Ø29.

M A T E R I A L E S

1. Bacterias

La estirpe utilizada como huésped no permisivo, B. subtilis 110Na try⁻ spo A⁻ (73) se obtuvo del Dr. P. Schaeffer. La estirpe supresora B. subtilis MO-101-P spo A⁻ thr⁻ {met⁻}⁺ su⁺ 44 (74) fué utilizada como huésped permisivo. La estirpe mutante en la DNA polimerasa I, B. subtilis HA101 (59)F pol A50 met⁻ his⁻ leu⁻ (75) se obtuvo del Dr. N. Cozzarelli. La estirpe E. coli N99(λ^+) se obtuvo del Dr. M. Rosenberg. La estirpe lisógeno del bacteriófago λ , E. coli K-12 Δ trp⁻ (λ N⁻cI857 H1) (= K-12 Δ H1 Δ trp) y la estirpe E. coli K-514 se obtuvieron del Dr. M. Zabeau. La estirpe E. coli NF2690, portadora de un plásmido derivado a su vez del plásmido pACYC177, conteniendo la mutación cI857 del represor del bacteriófago λ , se obtuvo de la Dra. T. Atlung. Las estirpes E. coli K-12 Δ H1 Δ trp portadoras del plásmido pKC30 A1 (conteniendo los genes 3, 4 y 5 de ϕ 29) ó del plásmido pKC30 A12 (conteniendo los genes 3 y 4 de ϕ 29) (76) se obtuvieron del Dr. J.A. García.

2. Fagos

La estirpe silvestre de ϕ 29 se obtuvo del Dr. B.E. Reilly (77). Los mutantes sensibles a supresor (sus) del fago ϕ 29, sus2(513), sus2(515), sus3(91), sus6(626) y sus17(112) se obtuvieron de la colección de Moreno y col. (73). El mutante sus17(741) de ϕ 29 se

obtuvo de la colección de Reilly y col. (77). Los mutantes sensibles a temperatura (ts) del fago Ø29, ts2(98) y ts5(17) se obtuvieron de la colección de Talavera y col. (78). El doble mutante de Ø29, sus2(513)sus3(91) fué preparado por J. Gutiérrez.

3. Plásmidos

Los plásmidos pBR322 (79) y pPLc28 (80) se utilizaron como vectores de clonaje. Los plásmidos pPLc28 y pPLc28 lig8 se obtuvieron del Dr. E. Remaut.

4. Medios de cultivo

La vitamina B1, la ampicilina, la kanamicina y la tetraciclina se compraron a Sigma; la triptona, el extracto de levadura y el agar se compraron a Difco; la D-glucosa y las sales se compraron a Merck.

5. Productos radioactivos

La {metil-³H}-timidina 5'-trifosfato (43 Ci/mmol), la {³⁵S}-metionina (1200 Ci/mmol), la {α-³²P}-deoxadenosina 5'-trifosfato (410 Ci/mmol), la {α-³²P}-dideoxiadenosina 5'-trifosfato (3000 Ci/mmol) y la {γ-³²P}-adenosina 5'-trifosfato (3000 Ci/mmol) se compraron a The Radiochemical Centre, Amersham.

6. Determinación de radioactividad

El PPO y el dimetil-POPOP se compraron a Sigma, el tolueno a C. Erba y el papel de fibra de vidrio Whatmann (GF/C y GF/A) a Reeve Angel.

7. Cromatografía

La DEAE-celulosa microgranular DE-32 y la Fosfocelulosa P11, se compraron a Whatmann. El Sephadex G-50 y la AD-agarosa se compraron a Sigma. Las placas de PEI-celulosa Polygram CEL 300 Pei a Macherey-Nagel (Düren, Alemania).

8. Electroforesis

La acrilamida y la N-N' metilenbisacrilamida se compraron a Serva. El SDS utilizado para las placas de gel se compró a BDH y la urea se compró a Merck. El TEMED, el PSA, el 2-mercaptoetanol, el azul de bromo-fenol, la agarosa, el bromuro de etidio, el azul de Coomassie (Azul Brillante R-250) y el SDS utilizado para el electrolito se compraron a Sigma.

9. Ensayo de actividad "in situ"

El SDS se compró a BDH, la acrilamida a Merck y la N-N' metilen-bisacrilamida a Eastman-Kodak.

10. Autorradiografía y Fluorografía

Para exposición de ^{35}S y ^{32}P se utilizaron películas Mafe RP-X1 ó Fuji RX. Para exponer ^{32}P se utilizaron pantallas intensificadoras Phillips, Ilford y Dupont. El revelador y fijador rápido para películas de rayos X se compró a Kodak, el papel 3MM a Whatmann y el salicilato sódico a Merck.

11. Enzimas y otras proteínas

La proteinasa K se compró a Merck, la nucleasa de micrococo a Worthington, la DNA polimerasa I de E. coli (fragmento Klenow y el enzima completo) y la polinucleótido-quinasa a Böehringer Manheim, la deoxi-nucleotidil-transferasa terminal a BRL y los enzimas de restricción a New England Biolabs. La seroalbúmina bovina y el citocromo C se compraron a Sigma. La DNA ligasa de T4 fué obtenida por J.M. Lázaro a partir de células de E. coli conteniendo el plásmido pPLc28 lig8.

12. Acidos nucléicos y nucleótidos

El poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈ y los deoxinucleótidos se compraron a PL-Biochemicals. El resto de los nucleótidos y el DNA de testículo de salmón se compraron a Sigma.

13. Drogas e inhibidores

La novobiocina, el ácido nalidíxico, la rifampicina y el cloranfenicol se compraron a Sigma. El BuAdATP se obtuvo del Dr. N.C. Brown. La aphidicolina y el HPUra se obtuvieron de Imperial Chemical Industries.

14. Otros productos

El Tris, el cloruro de cesio, el polietilenglicol 8000, el dextrano 500, el DTT, el EDTA, la alúmina, el Brij 58, la espermidina y el glicerol se compraron a Sigma. El cloruro de guanidina y el sulfato amónico se compraron a Schwarz/Mann. La sacarosa y el resto de las sales se compraron a Merck. El ácido acético y el ácido tricloroacético se compraron a Carlo Erba.

15. Equipo

- Baños de incubación Kowel y Selecta (Univeba-400).
- Baños de agua con agitación giratoria New Brunswick Co.Inc. modelo G-76.
- Incubador de aire con agitación New Brunswick Co. Inc. modelo G-25.
- Contador de colonias New Brunswick Co.Inc. modelo C-110.
- Estufas Heraus.
- Balanzas Mettler P1210N y H64.
- pHmetro Radiometer modelo 62.
- Agitador orbital Bellco Glass Inc.
- Bloques de calefacción Eppendorf thermostat 5320.
- Centrífugas de mesa Microfuge B (Beckman), Mikroliter (Hettich) y 5414 (Eppendorf).
- Centrífugas Sorvall GLC-2 y GLC-5.
- Ultracentrífugas Sorvall OTD-2 y Beckman L8-70.
- Cubetas para electroforesis Bio-Rad y Raven.
- Fuentes de alimentación LKB Biochrom 2117 y Bio-Rad 500/200.
- Secador de geles Hoefer SE1140.
- Colector de fracciones LKB Redirac 2112.
- Bomba peristáltica LBK Microperpex 2132.
- Conductivímetro Metrohm E382.
- Recogedor de gradientes Hoefer.
- Contador de centelleo líquido Intertechnique SL30.

- Espectrofotómetro Spectronic 20 y Shimadzu UV-240.
- Fermentador Chemap AG.
- Refrigerador Kelvinator AKM-107.
- Ultracongelador de -90°C Forma Bio-Freezer.

M E T O D O S

1. Medios de cultivo

El medio LB empleado para el crecimiento de las bacterias contenía 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de ClNa, SO_4Mg 5 mM y D-glucosa 20 mM. Cuando se indica, el medio LB fué suplementado con antibióticos a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

El medio mínimo (M9) se componía de glucosa 0.2%, triptófano 0.05 mg/ml, Vitamina B1 0.002 mg/ml, SO_4Mg 1 mM, 5 g/l de ClNH_4 , 25 g/l de ClNa, 75 g/l de PO_4HNa_2 y 15 g/l de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.

El diluyente de fago contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.8, Cl_2Mg 10 mM y ClNa 0.1 M.

El agar sólido de las placas Petri y el agar semisólido para plaqueo se prepararon, respectivamente, con medio LB y agar al 1.5% y con medio LB y agar al 0.6%.

2. Valoración de fago

Se siguió el procedimiento de Adams (81). De la muestra a valorar se hicieron diluciones sucesivas hasta tener unos 1000 fagos/ml. Se mezclaron, a 48°C, 0.1 ml de esta suspensión con 2 ml de agar semisólido fundido y 0.5 ml de bacteria indicadora en fase logarítmica en medio LB. La mezcla se extendió uniformemente sobre una placa Petri conteniendo agar sólido. Una vez solidificada se incubó la placa a 37°C durante la noche (30°C en el caso de los mutantes ts). Cada fago dió lugar a una placa

de lisis y, teniendo en cuenta la dilución realizada, se calculó la concentración de fago en la muestra original.

3. Preparación de mutantes de Ø29 en medio sólido

Los mutantes a obtener se plaquearon en la estirpe permisiva como se describe en el apartado 2, añadiendo aproximadamente 2×10^4 ufp/placa. El césped de bacteria quedaba totalmente lisado después de incubar durante la noche a 37°C (30°C en el caso de los mutantes ts). A cada placa se añadieron 4.5 ml de diluyente de fago y las placas se incubaron durante unas 4 horas a temperatura ambiente con agitación suave para resuspender el virus. La suspensión de fago se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm y 4°C en el rotor SS-34, para eliminar restos celulares. El virus, presente en el sobrenadante, se concentró por sedimentación a 42.000 rpm y 4°C durante 2 horas en el rotor Ti65 y resuspensión en un pequeño volumen de diluyente de fago. Posteriormente se purificó por centrifugación en un gradiente discontinuo de ClCs con capas de 1.3 ml de densidades 1.1, 1.3 y 1.5 g/cm³, a 50.000 rpm y 4°C, durante 35 minutos en el rotor SW65. La banda de fago que aparecía en la interfase entre las capas de densidad 1.3 y 1.5 se recogió y se dializó a 4°C frente a diluyente de fago. Las suspensiones de virus se conservaron a 4°C.

4. Crecimiento de células de B. subtilis e infección

Se creció B. subtilis HA 101(59)F a 37°C en medio LB hasta una concentración de 1×10^8 bacterias/ml. Las bacterias se infectaron a mdi 10 con Ø29 tipo salvaje o con los distintos mutantes sus y ts utilizados. En el caso de los mutantes sus, las bacterias se incubaron a 37°C hasta el minuto 45 después de la infección. En el caso de los mutantes ts las infecciones se realizaron a 30°C y/o a 44°C, incubándose durante 45 minutos (experimentos a 44°C) o durante 55 minutos (experimentos a 30°C). Transcurrido el tiempo post-infección, las células se enfriaron a 0°C y se centrifugaron a 8.000 rpm durante 5 minutos en el rotor GSA a 4°C. Las células sedimentadas se resuspendieron en un tampón que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5 y sacarosa al 10% y se volvieron a centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C en el rotor SS-34. El sedimento de bacterias se almacenó a -70°C.

5. Preparación de extractos celulares

5.1. Preparación de extractos de B. subtilis infectada por Ø29

Los extractos de células infectadas, se prepararon esencialmente como describen Peñalva y Salas (67).

5.1.1. Lisado y precipitación con sulfato amónico :

Fracción S-40

Las bacterias infectadas, procedentes de 400 ml de cultivo, se descongelaron y resuspendieron en 2 ml de Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, ClNa 0.125 M y lisozima (500 µg/ml). La lisis se produjo tras incubación durante 1 hora a 0°C. Los restos celulares y el DNA de alto peso molecular se eliminaron por centrifugación a 40.000 x g y 0°C durante 30 minutos, en el rotor Ti-65. Al sobrenadante (Fracción I) se le añadió lentamente sulfato amónico sólido hasta el 70% de saturación. El precipitado se sedimentó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 0°C en el rotor HB4. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el menor volumen posible de un tampón que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, DTT 0.1 mM y glicerol al 20% y se dializó durante 2 horas a 4°C frente a dos cambios de 0.5 l del mismo tampón, se repartió en alícuotas y se almacenó a -70°C. Esta fracción se denominó : Fracción-S40.

5.1.2. Eliminación del DNA de la Fracción I : Fracción de DEAE

Cuando se indique, 2 ml de la Fracción I (descrita anteriormente) se ajustaron a una concentración de ClK de 0.3 M y se pasaron por una columna de DEAE celulosa (Métodos, 18.1.2.1). El material que no se fijó a la columna se precipitó con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 70%. El precipitado se resuspendió en el menor volumen posible

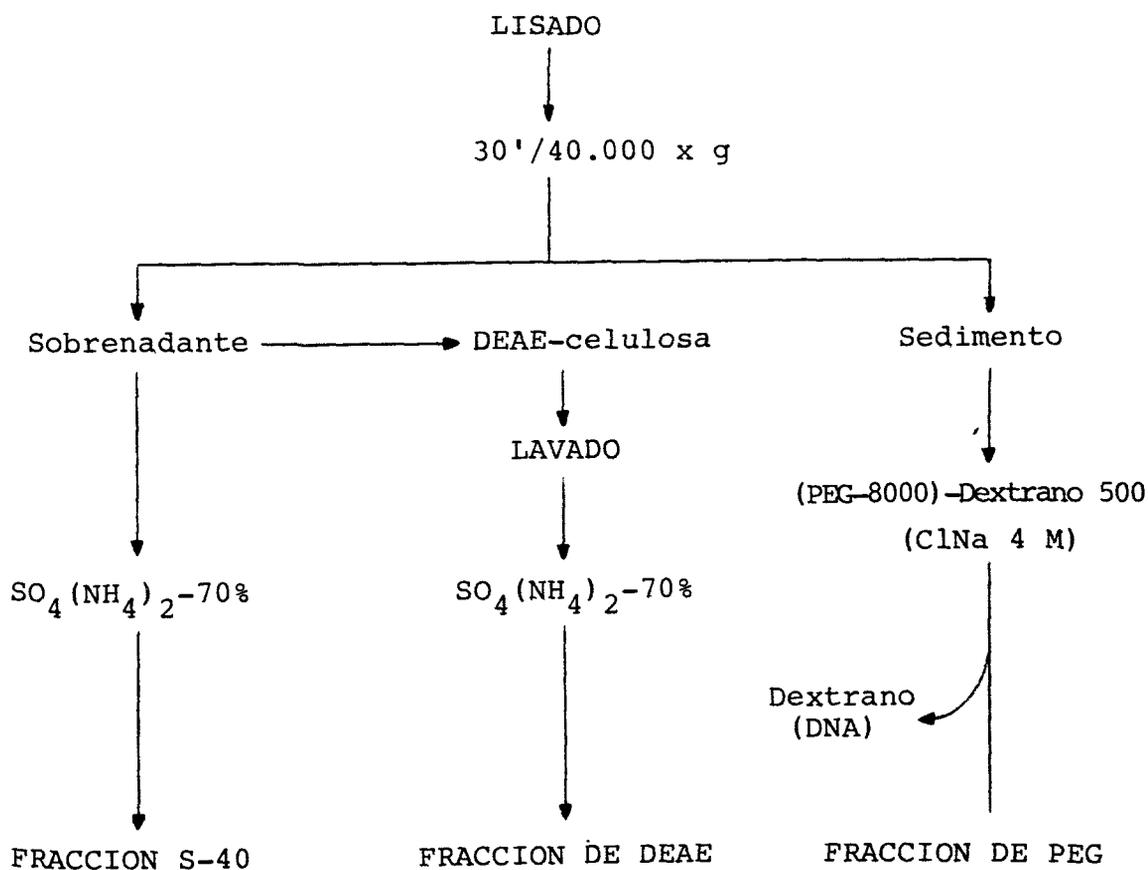
de Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, DTT 0.1 mM y glicerol al 20% y se dializó durante 2 horas a 4°C frente a 2 cambios de 0.5 l del mismo tampón, almacenándose a -70°C en alícuotas. Esta fracción se denominó : Fracción de DEAE.

5.1.3. Extracción de los restos celulares con sal alta : Fracción de PEG

Los restos celulares y el DNA bacteriano que sedimentaban en las condiciones descritas en el apartado 5.1.1, se resuspendieron en 1 ml de Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, añadiéndose 0.32 ml de una solución al 30% (p/v) de polietilenglicol-8000 y 0.12 ml de una solución al 20% (p/v) de dextrano-500. A la mezcla se le añadió lentamente ClNa sólido hasta una concentración final de 4 M, manteniéndose 30 minutos a 0°C con agitación. Las fases se separaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C en el rotor SS-34, quedando una fase superior que contenía el polietilenglicol y una fase inferior que se desechó (fase de dextrano) con la mayor parte del DNA. La fase de polietilenglicol se dializó durante 2 horas frente a 4 cambios de 0.5 l de Tris-ClH 50 mM, pH 7.5 para eliminar la mayoría del ClNa y se añadieron lentamente 0.2 g/ml de sulfato amónico sólido, manteniéndose 30 minutos a 0°C. Después de centrifugar durante 30 minutos a 10.000 rpm y 0°C en el rotor HB4 se descartó la fase superior que contenía el

polietilenglicol. A la fase inferior se le añadió lentamente 0.26 g/ml de sulfato amónico sólido y se mantuvo 30 minutos a 0°C con agitación, recogién dose el precipitado por centrifugación a 10.000 rpm y 0°C durante 30 minutos en el rotor HB-4. El precipitado se resuspendió en el menor volumen posible de Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, DTT 0.1 mM y glicerol al 20% y se dializó frente a dos cambios de 0.5 l del mismo tampón durante 2 horas a 4°C. Esta fracción se denominó : Fracción de PEG.

En el esquema 2 se resume la preparación de las diferentes fracciones descritas anteriormente :



5.2. Preparación de extractos de E. coli por lisis mecánica con alúmina

5.2.1. Preparación de extractos conteniendo proteína p3.

Extractos de E. coli K-12 Δ H1 Δ trp transformada con los plásmidos recombinantes pKC30 A1 y pKC30 A12 (76), conteniendo el gen 3 de ϕ 29, se prepararon tal y como describen García y colaboradores (76).

Las células se crecieron a 30°C en medio LB con el antibiótico ampicilina (50 μ g/ml). Cuando la densidad óptica a 420 nm fué 0.35 la temperatura se elevó a 42°C, continuándose la incubación durante 3 horas. Transcurrida la incubación se centrifugaron las células y el sedimento correspondiente a 250 ml de cultivo se lavó con Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, ClK 0.2 M, 2-mercaptoetanol 7 mM, EDTA 1 mM y glicerol 5% (v/v). El sedimento de células se lisó mecánicamente con dos veces su peso de alúmina, se resuspendió en 2 ml de la solución indicada anteriormente y se centrifugó durante 5 minutos a 15.000 x g para eliminar la alúmina y los restos celulares. El sobrenadante, pasado a través de una columna de Sephadex G-50 como se describe en Métodos (18.1), fué utilizado en el ensayo de iniciación descrito en Métodos (20.2).

5.2.2. Preparación de extractos conteniendo proteína p2.

Las estirpes de E. coli K-12 Δ H1 Δ trp y NF2690, transformadas por el plásmido recombinante pLBw2, conteniendo el gen 2 de ϕ 29, se crecieron en medio LB suple-

mentado con ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) y kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) en el caso de NF2690, y únicamente con ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) en el caso de K-12 $\Delta\text{H1}\Delta\text{trp}$. Con fines preparativos, las células NF2690 se crecieron en fermentador. En ambos casos las células se crecieron a una temperatura de 30°C hasta que la densidad óptica a 420 nm fué 0.6. Posteriormente, la temperatura se elevó a 42°C y la incubación se continuó durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se recogieron las células por centrifugación.

El sedimento celular se lisó con alúmina (2 veces en peso), se extrajo con 1 ml/gr de células, de una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, ClNa 50 mM y glicerol 5% (v/v), y se centrifugó a 20.000 x g durante 15 minutos para eliminar la alúmina y restos celulares.

En el caso de la estirpe NF2690 transformada con el plásmido pLBw2, el sedimento de células correspondiente a un mini-cultivo, crecido en las mismas condiciones, pero en presencia de (³⁵S)-Metionina, (ver Métodos, 10), fué resuspendido en 0.2 ml de la solución anterior y mezclado, previamente a la lisis con alúmina, con las células crecidas en el fermentador.

En algunos casos, el extracto obtenido a partir de las células K-12 $\Delta\text{H1}\Delta\text{trp}$ transformadas por el plásmido pLBw2, pasado previamente a través de una columna de Sephadex G-50, fué utilizado en el ensayo de iniciación descrito en Métodos (20.2). En otros casos, este extracto

fué precipitado con sulfato amónico y pasado a través de columnas de AD-agarosa, como se describe en Resultados (3.1).

En el caso de las células NF2690 transformadas con el plásmido pLBw2, el extracto obtenido, fraccionado con PEG/dextrano, precipitado con sulfato amónico y pasado a través de columnas de AD-agarosa y fosfocelulosa, fué utilizado para la purificación de la proteína p2, como se describe en Resultados (3.3).

5.3. Preparación de extractos por lisis con Brij 58.

Se prepararon siguiendo el método descrito por Watabe y col. (82), con ligeras modificaciones.

Células de E. coli NF2690 o de B. subtilis no infectadas o infectadas con el doble mutante sus2(513) sus3(91) de Ø29, se crecieron y se recogieron en las condiciones descritas en Métodos (4). El sedimento correspondiente a 1 g de células se resuspendió en 6 ml de una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, sacarosa 10% (p/v) y DTT 1 mM; a continuación se añadieron lisozima y EDTA a una concentración final de 300 µg/ml y 1 mM respectivamente, y la mezcla se incubó a 0°C durante 5 minutos. Posteriormente se añadió el detergente Brij 58 a una concentración final de 0.1% (p/v), manteniéndose la mezcla a 0°C durante 40 minutos. El lisado obtenido se ajustó a una concentración de ClNa igual a 0.8 M, centrifugándose a 45.000 rpm

durante 90 minutos en el rotor SW50.1 (Beckman). El sobrenadante se precipitó con sulfato amónico al 50% de saturación, y el precipitado se redisolvió en 3 ml de una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM y DTT 1 mM. Esta muestra fué pasada a través de una columna de DEAE-celulosa en las condiciones descritas en Métodos 18.1.2.1, y el material no fijado, precipitado nuevamente con sulfato amónico hasta el 50% de saturación, fué distribuido en alícuotas de 1.2 ml y centrifugado durante 15 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Los precipitados se almacenaron a -70°C. El sedimento correspondiente a cada alícuota fué resuspendido en 100 µl de Tris-ClH 20 mM, pH 7.5, antes de ser utilizado, resultando una concentración de proteínas de aproximadamente 20 mg/ml.

6. Preparaciones de DNA

6.1. DNA de plásmidos

Se utilizó el procedimiento de lisozima/Brij 58/deoxicolato de Clewell y Helinski (83), seguido por centrifugación a equilibrio de densidad en gradientes de ClCs-Br etidio.

En algunos casos el DNA de plásmidos fué aislado a partir de cultivos "de noche" en medio LB (conteniendo o no antibióticos), utilizando un método de purificación rápido basado en extracción alcalina como describen Birnboim y Doly (84).

6.2. DNA del bacteriófago Ø29

Se preparó a partir del mutante de lisis retardada sus14(1242) (85) por tratamiento con proteinasa K y extracción con fenol como describe Inciarte y col. (86).

6.3. Fragmento Hind III B del DNA de Ø29

Se obtuvo por digestión de DNA de Ø29, obtenido como se indicó anteriormente, con el enzima de restricción Hind III, seguido por separación en un gel de poli-acrilamida del 3.5% como se indica en Métodos (17.2.2), y purificación por cromatografía en DEAE celulosa como describen Escarmís y Salas (55).

6.4. DNA de Ø29 marcado con ^{32}P

Se preparó DNA de Ø29 marcado con ^{32}P por "nick translation", según el método descrito por Schleif y Wensink (87).

6.5. Obtención de complejo proteína p3-DNA de Ø29

El fago fué purificado previamente por gradiente de ClCs por capas, como se describe en Métodos (3).

Aproximadamente 40 µg, en equivalentes de DNA de fago, en 0.2 ml de Tris-ClH 50 mM, pH 7.8, ClNa 0.1 M y EDTA 10 mM, se trataron con un volumen de cloruro de guanidina 8 M (en Tris-ClH 10 mM, pH 7.5 y EDTA 1 mM) a 0°C durante 1 hora. Este tratamiento separa los cuellos-cola de las cabezas y permite la

salida del DNA (88). El complejo DNA-proteína se detectó por absorción a 260 nm y se dializó frente a Tris-ClH 50 mM, pH 7.5 y EDTA 0.5 mM, almacenándose a 4°C. Este material fué utilizado como molde en los ensayos de iniciación, replicación y elongación "in vitro" que se describirán más adelante.

7. Preparación de plásmidos recombinantes conteniendo el gen 2 de Ø29

7.1. Preparación del plásmido pBw2.

El fragmento Hind III B purificado (3 µg) fué digerido con el enzima de restricción Bcl I y ligado al plásmido pBR322 (3 µg), digerido a su vez con los dos enzimas de restricción Hind III + Bam HI, por incubación con DNA ligasa del bacteriófago T4, según las condiciones descritas por Murray y col. (89). Después de transformar, con esta mezcla de ligasa, células competentes de E. coli K-514, como se describió anteriormente en Métodos (8), las colonias de bacterias conteniendo el plásmido recombinante pBw2 fueron seleccionadas por sensibilidad al antibiótico tetraciclina y por análisis de restricción de minipreparaciones de DNA de plásmido seguido por análisis en geles de agarosa como se describe en Métodos (17.2.1).

7.2. Preparación del plásmido pLBw2.

El plásmido recombinante pBw2 (8 µg) fué digerido con los enzimas de restricción Eco RI + Pst I y ligado (en las condiciones descritas anteriormente) al plásmido pPLc28 (8 µg), digerido a su vez con los enzimas de restricción Eco RI + Hind III + Pst I. Después de transformar con esta mezcla de ligasa células competentes de E. coli N99 (λ^+) (como se describe en Métodos (8)), las colonias de bacterias, resistentes a ampicilina, conteniendo el plásmido recombinante pLBw2 fueron seleccionadas en primer lugar por hibridación a una sonda de DNA de $\phi 29$ marcado con ^{32}P como se indica en Métodos (9), y posteriormente por análisis de restricción de DNA de plásmido en geles de agarosa.

8. Preparación de células competentes de E. coli y transformación.

El desarrollo de competencia en células de E. coli se realizó según el método descrito por Lederberg y Cohen (90). A 200 µl de células competentes de E. coli se les adicionó en algunos casos la mezcla de ligasa correspondiente a las preparaciones de plásmidos recombinantes pBw2 y pLBw2, y en otros, DNA purificado de los plásmidos pLBw2 y pPLc28 (transformación directa), y esta mezcla se incubó en hielo durante 1 hora. Posteriormente, las células fueron sometidas a un choque térmico de 3 minutos a 42°C (en el caso de utilizar la

cepa de E. coli K-514 ó el lisógeno tipo salvaje para el represor de λ , E. coli N99(λ^+) o de 5 minutos a 34°C (en el caso de utilizar los lisógenos termoinducibles de represor de λ , E. coli K-12 Δ H1 Δ trp o E. coli NF2690) después de los cuales se añadió 5 ml de medio LB y las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C (cepas K-514 y N99(λ^+)) o a 30°C (lisógenos termoinducibles K-12 Δ H1 Δ trp y NF2690).

Después de concentrar las bacterias por centrifugación se resuspendieron en 0.5 ml de medio LB y, alícuotas de 0.1 ml, se plaquearon por extensión orbital con un asa de vidrio, sobre placas de medio LB conteniendo el antibiótico selectivo, incubándose posteriormente a 30°C.

9. Hibridación a sondas de DNA de ϕ 29 marcado con 32 P.

Las colonias de E. coli N99(λ^+) conteniendo el plásmido recombinante pLBw2 fueron seleccionadas por hibridación a DNA de ϕ 29 marcado con 32 P según modificación del método descrito por Grunstein y Hogness (91).

10. Análisis de las proteínas sintetizadas en células transformadas por el plásmido pLBw2.

Las estirpes de E. coli K12 Δ H1 Δ trp y NF2690 fueron transformadas directamente con el plásmido recombinante pLBw2 o con el plásmido control pPLc28 como se

describe en Métodos (8), y crecidas a 30°C en 2.5 ml de medio LB conteniendo el antibiótico ampicilina a una concentración de 50 µg/ml; cuando la densidad óptica a 420 nm fué 0.46, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en el mismo volumen de medio mínimo. Después de mantener la suspensión de células durante 1 hora a 30°C, la temperatura de incubación fué elevada a 42°C, y a los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 0.05 ml que fueron incubadas durante 5 minutos a 42°C en presencia de 10 µCi de (³⁵S) metionina (1200 Ci/mmol).

Cuando se indique, después de un pulso a 42°C en presencia de (³⁵S) metionina, se añadió un exceso de 1000 veces de metionina "fría", recogién dose alícuotas de 0.05 ml a diferentes tiempos de incubación a 42°C.

Las alícuotas tomadas en los diferentes casos fueron hervidas durante 5 minutos en una solución que contenía SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5%, urea 3 M y Azul de Bromofenol (0.05 mg/ml), y sometidas a electroforesis entre el 10% y el 20% de acrilamida en presencia de SDS, como se describe en Métodos (17.1.2). Los geles se secaron y autorradiografiaron determinándose la producción relativa de proteínas por densitometría de las autorradiografías. Estos valores se expresaron como % de la proteína total marcada, presente en cada canal del gel.

11. Tinción de proteínas

Después de ser sometidas a análisis electroforético, las proteínas presentes en el gel fueron teñidas con Azul de Coomassie (Azul Brillante R-250), según el método descrito por Fairbanks y colaboradores (92).

12. Valoración de proteínas

Rutinariamente se siguió el método de Bradford (93). Cuando se indica, la cantidad de proteína se estimó por densitometría, como se describe en el siguiente apartado, de las bandas teñidas en el gel, utilizando como patrón diferentes cantidades de SAB.

13. Densitometría

Se realizó por "lectura" de las autorradiografías con un microdensitómetro digital marca "Optronics", modelo PDP 11/45. Cuando se quiso efectuar la determinación a partir de un gel teñido, la densitometría se realizó sobre fotografías del mismo con la película Kodalith Ortofilm tipo 3.

14. Medida de conductividad

Los valores correspondientes a la conductividad de diferentes soluciones fueron obtenidas directamente o por extrapolación a partir de diluciones adecuadas, aplicando un volumen mínimo de 3 ml de solución a un resistivímetro Methrom-Herisau. Todas las determinaciones se realizaron a una temperatura de 40°C.

15. Medida de radioactividad

15.1. Radioactividad total

Las muestras se pipetearon sobre discos de papel Whatmann GF/A introducidos en tubos de polipropileno de 3 ml. Los discos se secaron a 120°C y se añadieron 2.5 ml de líquido de centelleo (4 g de PPO y 250 mg de dimetil-POPOP por litro de tolueno). Las muestras se introdujeron en viales de contaje y se determinó la radioactividad en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

15.2. Radioactividad insoluble en ácido tricloroacético

A las muestras se les añadió ácido tricloroacético hasta una concentración final del 5% y se mantuvieron durante treinta minutos a 0°C, filtrándose a vacío a través de discos de papel Whatmann GF/C de fibra de vidrio. Los discos se lavaron con ácido tricloroacético al 5%, se introdujeron en tubos de polipropileno de 3 ml y se secaron a 120°C, añadiéndose líquido de centelleo. Las muestras se introdujeron en viales de contaje y se determinó la radioactividad en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

15.3. Radiación Cerenkov

En caso de usarse ^{32}P , para las medidas de radioactividad total e insoluble en ácido tricloroacético no se añadió líquido de centelleo y la muestra se contó directamente como radiación Cerenkov, con el canal totalmente abierto. La eficiencia aproximada fué del 50%.

16. Autorradiografía y fluorografía

Para autorradiografía los geles de poliacrilamida se secaron a vacío a 80°C . En el caso de usarse como isótopo ^{32}P , se expusieron con pantallas intensificadoras de fosfotungstato a una temperatura de -70°C , utilizando películas Fuji RX.

Para fluorografía se siguió el método de Chamberlain (94). Los geles se fijaron en ácido acético al 10%, se lavaron con agua y se impregnaron con salicilato sódico 1 M durante 10 minutos. Se secaron a vacío a 80°C y se expusieron a -70°C con películas Fuji RX, preimpresionadas por un corto flash. Las películas se revelaron durante cinco minutos con revelador rápido para películas de rayos X y se fijaron durante cinco minutos con fijador rápido para uso fotográfico.

17. Electroforesis

17.1. Electroforesis de proteínas

Para muestras de proteína se usó el sistema de pH discontinuo descrito por Laemmli (95).

17.1.1 Preparación de muestras de proteína para electroforesis

Las muestras se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% durante 30 minutos a 0°C y se centrifugaron 5 minutos en una microfuga B (Beckman). El precipitado se lavó sucesivamente con 0.5 ml de etanol:éter (1:1) y 0.5 ml de etanol:éter (1:3). Los precipitados se secaron y resuspendieron en 60 µl de tampón de ruptura. Para volúmenes de muestra inferiores a 20 µl, se trató directamente la muestra con 60 µl de tampón de ruptura. En ambos casos, la muestra en presencia de este tampón, se calentó durante 5 minutos a 100°C y posteriormente se sometió a electroforesis.

El tampón de ruptura contenía Tris-ClH 0.0625 M, pH 6.8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% (v/v), urea 6 M y azul de bromofenol 0.05 mg/ml.

17.1.2. Electroforesis en placas de gel de poliacrilamida

Se utilizaron 3 tipos de geles de separación: gradientes lineales del 10.20% de acrilamida y geles del 10% o del 20% de acrilamida. Para los primeros se usaron placas de 30 cm de longitud, 1.3 mm de sección y 14 cm de anchura, y para los segundos, placas de 15 cm de longitud, 1.3 mm de sección y 14 cm de anchura.

El gel de separación contenía, además de acrilamida 10% (20%), Tris-ClH 0.325 M, pH 8.8, N-N' metilenbisacrilamida 0.25% (0.33%), SDS 0.1%, TEMED 0.1% (v/v) y 1/50 (v/v) de persulfato amónico (25 mg/ml).

El electrolito contenía Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1%.

La electroforesis en placas de 30 cm se corrió a temperatura ambiente durante 15 horas a 20 mA por gel. La electroforesis en placas de 15 cm se corrió a temperatura ambiente durante la noche, a 40 voltios por placa, y a continuación se subió el voltaje a 150 voltios hasta que el azul de bromofenol llegó a 1 cm del final del gel.

17.2. Electroforesis de DNA

17.2.1 En geles de agarosa

Se utilizaron geles con 1% de agarosa en Tris-borato 0.1 M, pH 8.3 y EDTA 2 mM, de 0.8 cm de espesor, que fueron desarrollados a 100 voltios. La longitud y anchura de los geles, así como la duración de la electroforesis, variaba según el número de muestras y las características del DNA a separar.

17.2.2 En geles de poliacrilamida

Rutinariamente se usaron geles de 30 cm de longitud, 14 cm de anchura y 1 mm de sección, conteniendo acrilamida 3.36%, N-N' metilenbisacrilamida 0.12%, Tris-borato 0.089%, ácido bórico 0.089%, EDTA 2 mM, TEMED 0.03% y 2.1 ml de una solución de persulfato amónico al 3% (p/v). En ocasiones, cuando se requerían condiciones desnaturalizantes, se utilizaron geles de poliacrilamida del 8%, conteniendo urea 8.3 M.

La electroforesis en geles de poliacrilamida del 3.5% se corrió a 175 voltios durante aproximadamente 5 horas, hasta que el azul de bromofenol llegaba a 1 cm del final del gel.

18. Cromatografía

18.1. En columna

18.1.1 Filtración en gel

Para eliminar el $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP no incorporado de la mezcla de incubación correspondiente a los ensayos de iniciación descritos en Métodos (20.1 y 20.2), se utilizaron columnas de 2 ml de Sephadex G-50 en pipetas Pasteur, equilibradas con Tris-ClH 50 mM, pH 8.8. El volumen de la muestra fué 0.05 ml. Se recogieron fracciones de 0.1 ml seleccionando aquellas correspondientes al volumen excluido detectado por radiación Cerenkov.

Para eliminar el $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP no incorporado de las mezclas de incubación correspondientes a los ensayos

de iniciación, elongación y replicación descritos en Métodos (20.3, 20.7 y 20.6), las muestras (0.05 ml) se centrifugaron a través de minicolumnas de Sephadex G-50 como describen Maniatis y cols. (96).

En otros casos, extractos de E. coli, preparados por lisis con alúmina como se describe en Métodos (5.2) fueron pasados a través de columnas de 10 ml de Sephadex G-50 equilibrada con Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, ClNa 50 mM y glicerol 5% (v/v), con objeto de eliminar el nucleótido endógeno presente en el extracto. Se recogieron fracciones de 0.5 ml, seleccionando aquellas correspondientes al volumen excluido, por determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 280 nm.

18.1.2 Intercambio iónico

18.1.2.1 DEAE-celulosa

Se utilizaron para eliminar el DNA de la Fracción I descrita en Métodos (5.1.1). 2 ml de esta fracción se ajustaron con ClK concentrado, a un valor de conductividad (determinado como se indica en Métodos (14) igual al de una solución de ClK 0.3 M y se pasaron por una columna de DEAE-celulosa de 30 ml (10 cm x 2 cm), equilibrada con Tris-ClH 50 mM, pH 7.5 y ClK 0.3 M, a una velocidad máxima de 8 ml/cm²/hora. Se recogieron fracciones de 1 ml y el material no fijado a la columna se detectó por espectrofotometría de las correspondientes diluciones de las fracciones.

También se utilizaron para eliminar el DNA residual de los extractos celulares preparados por lisis con Brij 58, como se describe en Métodos (5.3). Las muestras se pasaron a través de una columna de 30 ml de DEAE-celulosa, de 10 cm x 2 cm, equilibrada con Tris-ClH 50 mM, pH 7.6, DTT 1 mM y EDTA 1 mM. Después del paso de la muestra, se eluyó la columna con la solución anterior conteniendo ClNa 0.4 M. El material eluido, detectado por valoración de la absorbancia a 280 nm de las diferentes fracciones, fué precipitado con sulfato amónico y almacenado en las condiciones descritas en Métodos (5.3).

18.1.2.2 Fosfocelulosa

Se utilizó para purificar la proteína p2 como se describe en Resultados (3.3). Una alícuota del 20% del total de la fracción, descrita en Resultados (3.3), eluida con ClNa 0.7 M de la columna de AD-agarosa, se diluyó con un volumen de glicerol de manera que el valor de la conductividad fué 4 mSiemens. Esta muestra se pasó a una velocidad de 1 ml/hora a través de una columna de 2 ml de fosfocelulosa (1.8 x 1.2 cm), equilibrada con 25 volúmenes de una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, ClNa 50 mM y glicerol 5% (v/v), a una velocidad de 4 ml/hora. Se recogió el volumen correspondiente al paso de muestra, y posteriormente se pasaron 25 volúmenes de la solución anterior a una velocidad de 4 ml/hora,

recogiéndose fracciones de 2 ml.

El material no fijado a la columna, correspondiente mayoritariamente al paso de la muestra, y residualmente a las primeras fracciones de 2 ml recogidas, constituyeron la fracción : LAVADO.

Posteriormente, la columna se eluyó sucesivamente con 10 volúmenes de una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.0, DTT 1 mM glicerol 5% (v/v) y ClNa a una concentración de 0.4 M o 0.6 M, y a una velocidad de 4 ml/hora recogiéndose fracciones de 0.3 ml. La elección de fracciones se realizó por determinación directa de radioactividad.

18.1.3 Afinidad : Azul-Dextrano agarosa (AD-agarosa)

Preparación de la columna

Se preparó una columna de 40 ml de AD-agarosa (15 cm x 1.8 cm) que fué tratada previamente con 25 volúmenes de ClK 3 M a una velocidad de 50 ml/hora. Posteriormente se equilibró con 25 volúmenes de una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5 y Cl₂Mg 10 mM (tampón A), a una velocidad de 50 ml/hora.

A continuación, y con objeto de saturar los sitios de fijación inespecífica presentes en la columna de AD-agarosa, se pasaron 1.5 volúmenes de una disolución de lisozima (150 µg/ml) en el tampón A, descrito anteriormente, a una velocidad de 6 ml/hora. El exceso de lisozima fué eliminado reequilibrando la columna con

25 volúmenes de tampón A, a una velocidad de 50 ml/hora.

Carga de la muestra y condiciones de elución

La muestra, ajustada con tampón A a un valor de conductividad de 6 mSiemens, fué cargada en la columna a una velocidad de 6 ml/hora. Una vez que hubo entrado la muestra, se pasaron 10 volúmenes de tampón A, a una velocidad de 12 ml/hora, recogiendo fracciones de 5 ml que constituyeron la fracción : LAVADO.

Posteriormente, la columna se eluyó con 5 volúmenes de Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, Cl_2Mg 1 mM y ATP 1 mM (tampón B), a una velocidad de 12 ml/hora, recogiendo fracciones de 5 ml que constituyeron la fracción : ATP 1 mM.

A continuación, la columna se eluyó sucesivamente con 8 volúmenes de tampón B conteniendo concentraciones crecientes de ClNa (0.2 M, 0.35 M, 0.5 M, 1 M), en el caso descrito en Resultados (3.1), y (0.35 M, 0.7 M, 1 M) en el descrito en Resultados (3.3), a una velocidad de 24 ml/hora. En todos los casos se recogieron fracciones de 3 ml que constituyeron las fracciones : ClNa 0.2 M, ClNa 0.35 M, ClNa 0.5 M, ClNa 0.7 M y ClNa 1 M.

En el caso descrito en Resultados (3.1), la elección de fracciones se realizó por lectura de la absorbancia a 280 nm, mientras que en el caso descrito en Resultados (3.3), la elección se realizó por determinación directa de radioactividad.

18.2 Cromatografía en capa fina

El material nucleotídico hidrolizado por la DNA polimerasa de $\phi 29$ correspondiente al ensayo de actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5' sobre {3'-³²P}-DNA desnaturizado, fué analizado por cromatografía en capa fina sobre placas de polietilenimina-celulosa.

Se utilizaron placas para cromatografía de intercambio iónico (PEI-celulosa) de 6 x 6 cm. Las muestras, en un volumen máximo de 10 μ l, se aplicaron con capilares de vidrio de 0.5 μ l a aproximadamente 1 cm del borde. Las placas se desarrollaron en sentido ascendente, hasta que el frente alcanzó la parte superior, utilizando como fase móvil HCOOLi 0.15 M, pH 3.0 y corriéndose en todos los casos 5 μ g de dAMP como marcador interno. Después de determinar la posición del marcador iluminando la placa con luz ultravioleta de 254 nm, se señaló su posición y el cromatograma se sometió a autorradiografía utilizando pantallas intensificadoras de fosfotungstato, a una temperatura de -70°C.

19. Centrifugación

19.1. Centrifugación analítica de DNA en gradientes alcalinos de sacarosa

Las muestras, desnaturizadas previamente por tratamiento con NaOH 0.1 M, se sometieron a centrifugación durante 2.5 horas a 50.000 rpm y 25°C en el rotor SW65, a través de un gradiente de 5 ml del 5-20% de

sacarosa en presencia de NaOH 0.1 M, EDTA 10 mM y ClNa 0.9 M. Cuando se analizó el DNA marcado con ^{32}P en el ensayo de replicación descrito en Métodos (20.6), se añadió a cada muestra DNA de Ø29 tratado con proteinasa K, como marcador interno.

Se recogieron fracciones de 0.2 ml a partir del fondo del tubo, determinándose la radioactividad Cerenkov, así como la absorbancia a 260 nm.

19.2. Centrifugación en gradientes de glicerol

2.4 μg de la fracción de fosfocelulosa conteniendo proteína p2, descrita en Resultados (3.3), con una pureza de aproximadamente el 86%, se sometió a centrifugación durante 19 horas a 380.000 x g en un gradiente de glicerol entre el 15-30% (v/v) en una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5 y ClNa 0.2 M. La centrifugación se realizó a 0°C en el rotor SW65, utilizando tubos de polialómero de 5 ml. Transcurrida la centrifugación se recogieron fracciones de 0.2 ml, pinchando la parte inferior de los tubos por medio de un recogedor de gradientes.

20. Ensayos de actividad

20.1. Ensayo para la formación del complejo p3-dAMP

(Reacción de Iniciación) con extracto de células infectadas
(SISTEMA CRUDO)

Muestras de las diferentes fracciones (aproximadamente 75 μg) se incubaron en una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 0.05 ml, Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, Cl_2Mg 10 mM, ATP 1 mM y $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 0.25 μM

(400 Ci/mmol). Cuando se indique se añadió 0.5 μ g de complejo p3-DNA de ϕ 29 como molde. Después de incubar durante 20 minutos a 30°C, la reacción se paró añadiendo EDTA hasta 10 mM y SDS hasta 0.1% y la mezcla se mantuvo 10 minutos a 68°C para disociar interacciones no covalentes. El dATP no incorporado se eliminó por filtración en gel (Métodos 18.1.1). Las fracciones del volumen excluido se trataron con 25000 u/ml de nucleasa de micrococo durante 30 minutos a 37°C, y se prepararon para electroforesis. Las diferentes muestras se sometieron a electroforesis en placas de gel de poliacrilamida conteniendo acrilamida 10% y SDS al 0.1%. Posteriormente, los geles se secaron y autorradiografiaron con pantallas intensificadoras a una temperatura de -70°C. La reacción se cuantificó por determinación de la radiación Cerenkov correspondiente a la banda de p3-dAMP, recortada del gel, y por densitometría de las autorradiografías, como se describe en Métodos (15.3 y 13).

20.2. Ensayo para la formación del complejo p3-dAMP (Reacción de Iniciación) con extractos de E. coli transformada con plásmidos conteniendo diferentes genes de ϕ 29

Para estos ensayos se utilizaron extractos de E. coli K-12 Δ H1 Δ trp transformada con los plásmidos conteniendo el gen 3 de ϕ 29 : pKC30 A1 o pKC30 A12 (76),

o conteniendo el gen 2 de Ø29 : pLBw2, que se prepararon por lisis con alúmina y posterior cromatografía en Sephadex G-50, como se describe en Métodos (5.2 y 18.1.1).

La mezcla de reacción fué la misma que se describe en Métodos (20.1), siempre en presencia de 0.5 µg de p3-DNA de Ø29 como molde, 18 µg de proteína de los extractos de E. coli conteniendo el plásmido pLBw2 ó el plásmido control pPLc28 y 30 µg de proteína de extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2(513), todos ellos preparados como se indica en Métodos (6.5, 5.2 y 5.1). Cuando se indique, se sustituyó el extracto de B. subtilis infectada con sus2(513) por 30 µg de proteína de extractos de E. coli conteniendo los plásmidos pKC30 A1 o pKC30 A12, o por 40 ng de proteína p3 purificada (97). En ocasiones, y como se describe en Resultados (3.1), se utilizaron extractos de E. coli conteniendo el plásmido pKC30 A1 complementados con diferentes fracciones de purificación de extractos de E. coli conteniendo el plásmido pLBw2. Después de incubar durante 20 minutos a 30°C, las muestras se procesaron como se describe en Métodos (20.1).

20.3. Ensayo de iniciación "in vitro" (SISTEMA PURIFICADO)

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 0.05 ml, Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, Cl₂Mg 10 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, espermidina 1 mM {α-³²P}-dATP 0.25 µM

(5 μ Ci, 410 Ci/mmol), 0.5 μ g de complejo proteína p3-DNA de ϕ 29 y la cantidad de proteína p2 purificada indicada en cada caso. Cuando se indica, se omitió el ATP de la mezcla de iniciación.

Cuando se indica, se utilizaron extractos de E. coli transformada con el plásmido pKC30 A1, extractos de B. subtilis infectada con un mutante sus2 de ϕ 29 o proteína p3 purificada (obtenida de Ignacio Prieto), como dadores de proteína terminal libre.

Cuando se indica, se utilizaron extractos de E. coli o de B. subtilis no infectada o infectada con el doble mutante sus2(513)sus3(91) de ϕ 29, como dadores del factor(es) celular.

Después de incubar durante 20 minutos a 30°C, las muestras se centrifugaron a través de minicolumnas de Sephadex G-50, como se describe en Métodos (18.1.1), y se procesaron como se describe en Métodos (20.1).

20.4. Ensayo de DNA polimerasa

La mezcla de incubación para el ensayo de DNA polimerasa contenía, en un volumen final de 0.05 ml, Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, Cl₂Mg 10 mM, ATP 1 mM, espermidina 1 mM, DTT 1 mM, glicerol 5% (v/v), SAB (5 μ g) (³H)-TTP 10 μ M (2 μ Ci; 43 Ci/mmol) y poli (dA)-(dT)₁₂₋₁₈ (0.5 μ g), como molde-"primer".

Cuando se ensayaron otros DNAs como molde, se añadieron dATP, dGTP y dCTP a una concentración de 20 μ M

cada uno. Después de incubar a 30°C durante los tiempos indicados, se determinó la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético.

20.5. Ensayo de actividad DNA polimerasa "in situ"

Este ensayo fué llevado a cabo esencialmente como describen Karawya y colaboradores (98).

20.5.1. Electroforesis en gel y renaturalización de proteínas

Se utilizaron placas de gel de poliacrilamida-SDS, en las condiciones descritas por Laemmli (95).

El gel de separación (14 cm x 10 cm x 0.75 mm) contenía Tris-ClH 0.375 M, pH 8.8, SDS 0.1%, EDTA 2 mM, TEMED 0.1% (v/v), PSA 0.1% (p/v), acrilamida 10%, bisacrilamida 0.275% y DNA activado (144 µg/ml).

El gel de concentración (14 cm x 2 cm x 0.75 mm) contenía Tris-ClH 0.15 M, pH 6.8, SDS 0.12%, TEMED 0.1% (v/v), PSA 0.1% (p/v), acrilamida 6% y bisacrilamida 0.08%.

Las muestras, en un volumen de 20 µl, se mezclaron con 9 µl de una solución que contenía SAB (0.15 mg/ml), SDS 4%, 2-mercaptoetanol 2% (v/v), glicerol 36% (v/v) y azul de bromofenol (0.02 mg/ml), se calentaron durante 3 minutos a 37°C y se sometieron a electroforesis.

La electroforesis se desarrolló en condiciones de refrigeración por circulación de H₂O (10-15°C) a una

corriente constante de 25 mA, parándose aproximadamente después de 2-2.5 horas, cuando el azul de bromofenol alcanzó el final del gel de separación. Inmediatamente después, el gel fué sumergido en 1 litro de Tris-ClH 50 mM, pH 7.5 (mantenido a 25°C), y después de agitación suave durante 15 minutos, se repitió el proceso con un nuevo litro de la misma solución. Posteriormente los geles se incubaron durante 16 horas a 4°C en 1 litro de Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, que se cambió nuevamente, finalizándose la incubación después de 1 hora a 4°C.

Uno de los requisitos más importantes para el éxito de este ensayo está en la utilización de un SDS limpio de contaminantes de naturaleza lipofílica, los cuales inhiben la renaturalización de las proteínas presentes en el gel (99).

20.5.2. Ensayo de actividad DNA polimerasa

Los geles, colocados en bandejas de plástico, fueron cubiertos con 40 ml de una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, Cl_2Mg 6 mM, ClK 40 mM, SAB (400 $\mu\text{g/ml}$), glicerol 16% (v/v), EDTA 0.01 mM, DTT 1 mM, dCTP/dGTP/TTP 12.5 μM (cada uno) y $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 1 μM (250 $\mu\text{Ci}/410 \text{ Ci/mmol}$). La incubación se realizó a 37°C durante 12 horas.

20.5.3. Análisis del producto marcado con ^{32}P

Después de la incubación, los geles fueron sumergidos a 25°C en 1 litro de una solución que contenía ácido tricloroacético 5% (p/v) y pirofosfato sódico 1% (p/v), (TCA-PPI), y fueron agitados suavemente en una plataforma durante 15 minutos. El líquido se eliminó, repitiéndose 2 veces este procedimiento de lavado. Posteriormente, los geles se transfirieron a TCA-PPI fresco, y se agitaron suavemente durante 16 horas a 4°C. Este lavado a 4°C se repitió durante otras 4 horas. Por fin, los geles se transfirieron a papel Whatmann 3 MM, siendo secados y sometidos a autorradiografía.

20.6. Ensayo de replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de $\phi 29$

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 0.05 ml, Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, Cl_2Mg 10 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, espermidina 1 mM, $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 10 μM (2 μCi , 410 Ci/mmol), dGTP/dCTP/TTP 20 μM (cada uno), glicerol 5% (v/v), SAB (0.1 mg/ml) y 1 μg de complejo p3-DNA de $\phi 29$.

Además de las proteínas p2 y p3 purificadas, se añadieron los componentes indicados en cada caso. Después de incubar durante 20 minutos a 30°C, la reacción se paró por adición de EDTA 10 mM y SDS 0.1%, y por calentamiento a 68°C durante 10 minutos. Posteriormente las muestras se filtraron a través de minicolumnas de Sephadex

G-50, como se describe en Métodos (18.1.1), determinándose la radiación Cerenkov de la fracción excluída. Cuando se indica, el material excluido fue sometido a análisis de restricción como se describe en Métodos (21).

20.7. Ensayo de elongación "in vitro" del complejo p3-DNA de Ø29

Se incubaron las proteínas p2 y p3 purificadas con complejo p3-DNA de Ø29 como molde durante 10 o 15 minutos a 30°C en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP, en las condiciones indicadas en cada caso. Posteriormente se añadieron IgG anti-p3 (24 µg), para inhibir posteriores iniciaciones y, a los tiempos indicados, se aumentó la concentración de dATP hasta 10 µM, adicionándose el resto de los dNTPs a una concentración de 20 µM cada uno. La incubación se continuó a una temperatura de 30°C con las adiciones indicadas en cada caso. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas, parándose la reacción por adición de EDTA 10 mM y SDS 0.1%, y por calentamiento a 68°C durante 10 minutos. El DNA marcado fué sometido a análisis de restricción como se describe en Métodos (21).

20.8. Ensayo de actividad exonucleasa

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 0.05 ml, Tris-ClH 50 mM, Cl_2Mg 10 mM, ATP 1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM y las cantidades de proteína p3 y $\{3'-^{32}\text{P}\}$ o $\{5'-^{32}\text{P}\}$ -DNA nativo o desnaturalizado, indicadas en cada caso. Después de 20 minutos de incubación a 37°C, se precipitaba con etanol y se determinaba la radiación Cerenkov del material soluble. Cuando se indique, el precipitado de etanol se disolvió en Tris-ClH 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM, y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida del 8%, como describen Escarmís y Salas (55). Después de la electroforesis, el gel se secó y se autorradiografió con pantallas intensificadoras a una temperatura de -70°C.

El $\{3'-^{32}\text{P}\}$ -DNA utilizado para estos ensayos se preparó por marcaje de fragmentos de restricción con deoxinucleotidiltransferasa terminal y $\{\alpha-^{32}\text{P}\}$ -dideoxi-ATP (regalo de C. Escarmís) o con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E. coli y $\{\alpha-^{32}\text{P}\}$ -dATP (obtenido de R. Blasco). El $\{5'-^{32}\text{P}\}$ -DNA fué obtenido por marcaje con polinucleótido kinasa y $\{\gamma-^{32}\text{P}\}$ -ATP (obtenido de C. Escarmís).

21. Análisis de restricción del DNA de Ø29 sintetizado "de novo"

El DNA marcado en los ensayos de replicación y elongación descritos en Métodos (20.6 y 20.7), utilizando complejo p3-DNA de Ø29 como molde fué tratado con proteinasa K (200 µg/ml) en presencia de SDS 0.5%, durante 5 horas a 37°C. Las muestras fueron filtradas a través de minicolumnas de Sephadex G-50, como se describe en Métodos (18.1.1) y las fracciones excluidas fueron tratadas con fenol/cloroformo como describen Maniatis y col. (96), precipitadas con etanol en presencia de acetato sódico 0.3 M y digeridas con el enzima de restricción Hind III en las condiciones indicadas por el proveedor. Los fragmentos de restricción fueron separados en un gel de poliacrilamida del 3.5%, como se describe en Métodos(17.2.2). Después de la electroforesis, el gel fué secado y autorradiografiado con pantallas intensificadoras a -70°C. La cuantificación se realizó cortando las bandas del gel y contando la radiación Cerenkov, como se describe en Métodos(15.3).

R E S U L T A D O S

1. Factores implicados en la iniciación de la replicación del DNA de Ø29 (SISTEMA CRUDO)

El modelo propuesto para la replicación del DNA del bacteriófago Ø29 basa su originalidad en la presencia de una proteína viral unida covalentemente a ambos extremos 5' de su DNA, la cual, en estado libre, reaccionaría con el primer nucleótido de la cadena a partir de ambos extremos 5' formando un complejo covalente proteína-5' dAMP que funcionaría como "primer", suministrando el extremo 3'-OH libre necesario para la elongación por la DNA polimerasa.

El desarrollo de un sistema "in vitro" dependiente de extractos de B. subtilis infectada por el bacteriófago Ø29 ha permitido demostrar y caracterizar la formación de un complejo covalente entre la proteína terminal, p3, y 5'-dAMP (REACCION DE INICIACION) (67). Además, se ha demostrado que este complejo de iniciación p3-dAMP funciona realmente como "primer" para la posterior elongación del DNA de Ø29 (67), lo cual apoya fuertemente el modelo propuesto.

Como primer objetivo de este trabajo nos propusimos averiguar qué genes virales de aquellos implicados en la replicación del DNA de Ø29 "in vivo" (72), eran requeridos para la reacción de iniciación, es decir, para la deoxiadenilación de la proteína terminal p3. Para ello, se utilizaron extractos de Bacillus subtilis infectada

con mutantes de $\phi 29$ sensibles a supresor (sus) y sensibles a temperatura (ts) en los cistrones que codifican proteínas necesarias para la síntesis de DNA de $\phi 29$, que fueron suplementados con complejo p3-DNA exógeno, preparado como se describe en Métodos (6.5).

También se estudió el requerimiento, en esta reacción, de ATP y enzimas implicados en la replicación del genoma del huésped.

1.1. Requerimiento de los productos de los genes 2 y 3 virales en la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP

Se prepararon extractos a partir de células de B. subtilis infectadas con el mutante de $\phi 29$ sus3(91): Fracción de DEAE, como se describe en Métodos (5.1.2) y posteriormente se analizó su actividad en la formación del complejo de iniciación p3-dAMP mediante incubación "in vitro" con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP y complejo p3-DNA en las condiciones de ensayo indicadas en Métodos (20.1). En estas condiciones, y como se observa en la Figura 5, no se detectó la formación de la banda correspondiente al complejo de iniciación p3-dAMP en el análisis electroforético del material marcado con ^{32}P .

Este resultado demuestra el requerimiento de proteína p3 libre, de nueva síntesis, para la formación del complejo de iniciación p3-dAMP puesto que en las células de B. subtilis infectadas con el mutante sus3(91) de Ø29 no debería sintetizarse proteína p3 intacta.

El requerimiento del producto del gen 2 de Ø29 se demostró utilizando, en primer lugar, extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2(513) : Fracción de PEG, preparados como se describe en Métodos (5.1.3) y ensayados "in vitro" como se indicó anteriormente.

Como se muestra en la Figura 5, tampoco en este caso hubo formación de complejo de iniciación p3-dAMP marcado con ^{32}P ; sin embargo, cuando en un ensayo de complementación "in vitro" se utilizó una mezcla de extractos de B. subtilis infectada con sus3(91) : Fracción de DEAE y extractos infectados con sus2(513): Fracción de PEG, se recuperó la actividad de iniciación.

Los resultados anteriores indican que la formación del complejo de iniciación p3-dAMP requiere la presencia simultánea de los productos génicos 2 y 3 virales. Sin embargo, y asumiendo que las fracciones utilizadas podían carecer diferencialmente (debido al

sus 3 sus 2 sus3+sus2
 +p3- DNA +p3-DNA +p3-DNA ³⁵S-Ø29

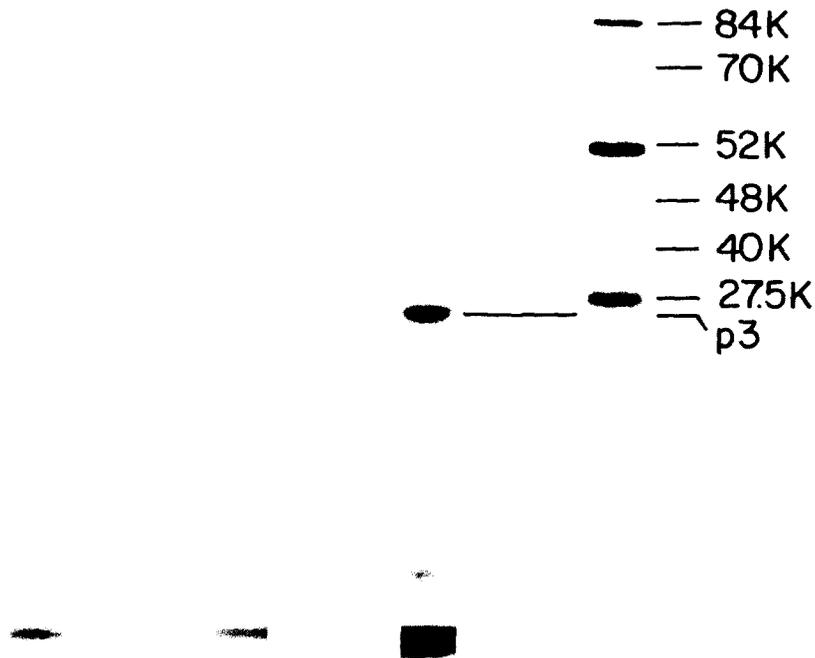


Figura 5. Efecto de mutaciones sus en los genes 2 y 3 virales en la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP. Extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2(513) : fracción de PEG, ó con el mutante sus3(91) : fracción de DEAE, se incubaron con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP, ATP y p3-DNA como se describe en Métodos (20.1). Después del tratamiento con nucleasa de micrococo las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y a autorradiografía. En la electroforesis se corrió una muestra de las proteínas estructurales de Ø29 marcadas con ³⁵S, como marcadores de peso molecular (indicado en Kilodaltons).

proceso de preparación) de algún factor viral o celular, diferente a las proteínas p2 y p3, que fuese requerido en esta reacción, se repitieron los ensayos de iniciación "in vitro" utilizando diferentes etapas de fraccionamiento de los extractos. Debido a que los extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus3(91) : Fracción de DEAE pudieron ser complementados con proteína p3 purificada (97), quedó confirmado el requerimiento del producto del gen 3 viral, así como descartada la posibilidad de que esta fracción de DEAE careciese de algún factor, adicional a la proteína p3, que fuese igualmente necesario para la reacción de iniciación.

Como se observa en la Figura 6A, ni la fracción-S40 ni la fracción de PEG preparadas a partir de B. subtilis infectada con el mutante sus2(513) dieron lugar a la formación de la banda de p3-dAMP marcada con ^{32}P en la reacción de iniciación (canales b y c); sin embargo la actividad se recuperó cuando cada una de ellas fué complementada con la fracción de DEAE de células infectadas con sus3(91) (canales d y e). Por último, cuando se mezcló la fracción-S40 y la fracción de PEG correspondientes a las células infectadas con el mutante sus2(513), no se restauró la actividad formadora del complejo p3-dAMP (resultados no mostrados).

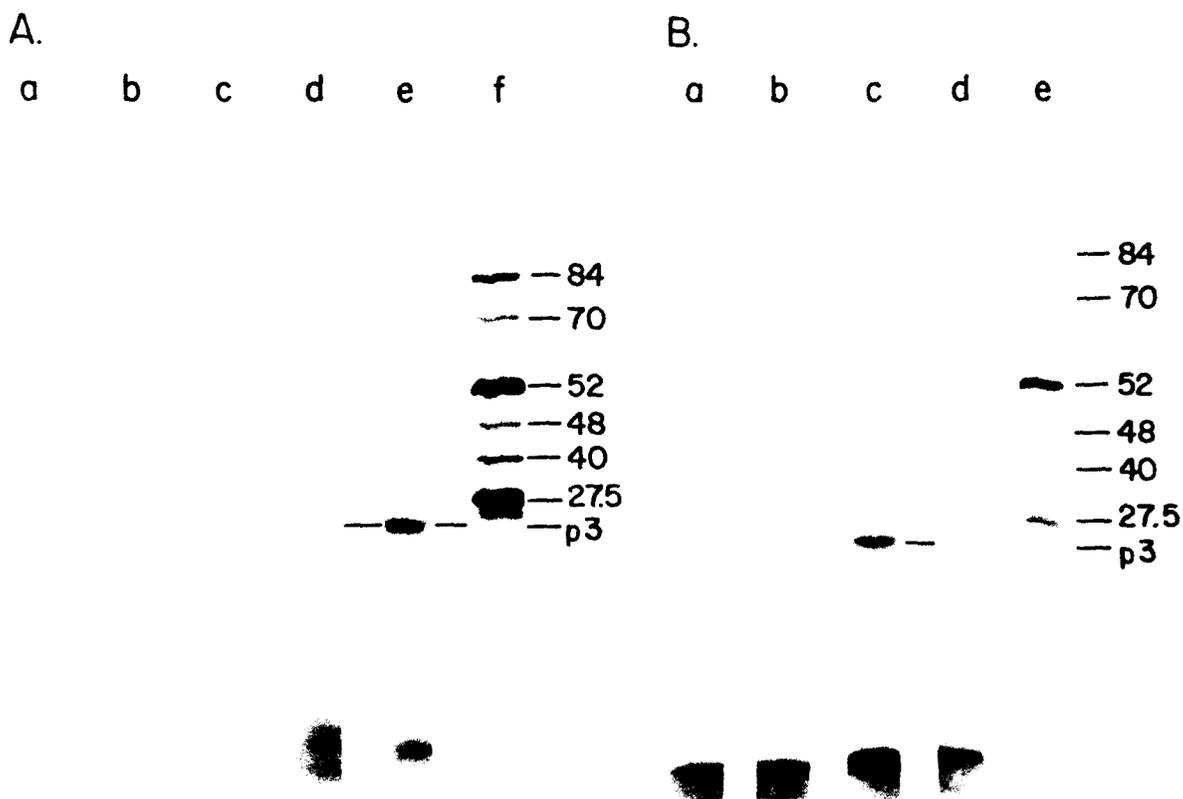


Figura 6. Efecto de dos mutaciones sus diferentes en el gen 2 sobre la formación del complejo de iniciación p3-dAMP. Parte A : Extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2(513) : fracción S-40 ó fracción de PEG, o con el mutante sus3(91) : fracción de DEAE, se incubaron con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP, ATP y p3-DNA tal y como se describe en Métodos (20.1). Después del tratamiento con nucleasa de micrococo las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y a autorradiografía. Canales : a. sus3(91); b. sus2(513) : fracción-S40; c. sus2(513) : fracción de PEG; d. sus2(513): fracción-S40 + sus3(91); e. sus2(513) : fracción de PEG + sus3(91); f. marcadores de peso molecular (las cifras indican Kilodaltons).

Parte B : Extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2(513) : fracción de PEG o con el mutante sus3(91) :

fracción de DEAE, se incubaron como se indica en la parte A. Canales : a. sus3(91); b. sus2 (515); c. sus2(515) + sus3(91); d. igual que "c" pero sin p3-DNA; e. marcadores de peso molecular (las cifras indican Kilodaltons).

Para determinar si los resultados obtenidos con el mutante sus2(513) eran específicos de ese mutante en particular, debido quizás a alguna mutación críptica, se prepararon extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2(515) : Fracción de PEG, que fueron probados en la formación del complejo p3-dAMP. Como se muestra en la Figura 6B (canales b al d), esta fracción fué activa únicamente cuando se complementó con extractos de células infectadas con sus3(91) : Fracción de DEAE y únicamente en presencia de complejo p3-DNA de Ø29 como molde. Además, y como se muestra en la Figura 7, una fracción-S40 preparada a partir de células infectadas a 44°C con el mutante ts2(98) no fué activa en la formación del complejo de iniciación a menos que fuese complementada con la fracción de DEAE de células infectadas con el mutante sus3(91) y en presencia de complejo p3-DNA como molde (Figura 7, canales d al f). Cuando la infección con el mutante ts2(98) fué realizada a temperatura permisiva, estos extractos fueron activos por sí solos en la formación del complejo de iniciación p3-dAMP incluso cuando no fueron suplementados con p3-DNA exógeno (Figura 7, canales a al c).

Por tanto, los resultados anteriores demuestran que la formación del complejo de iniciación p3-dAMP "in vitro" requiere la presencia de proteína terminal

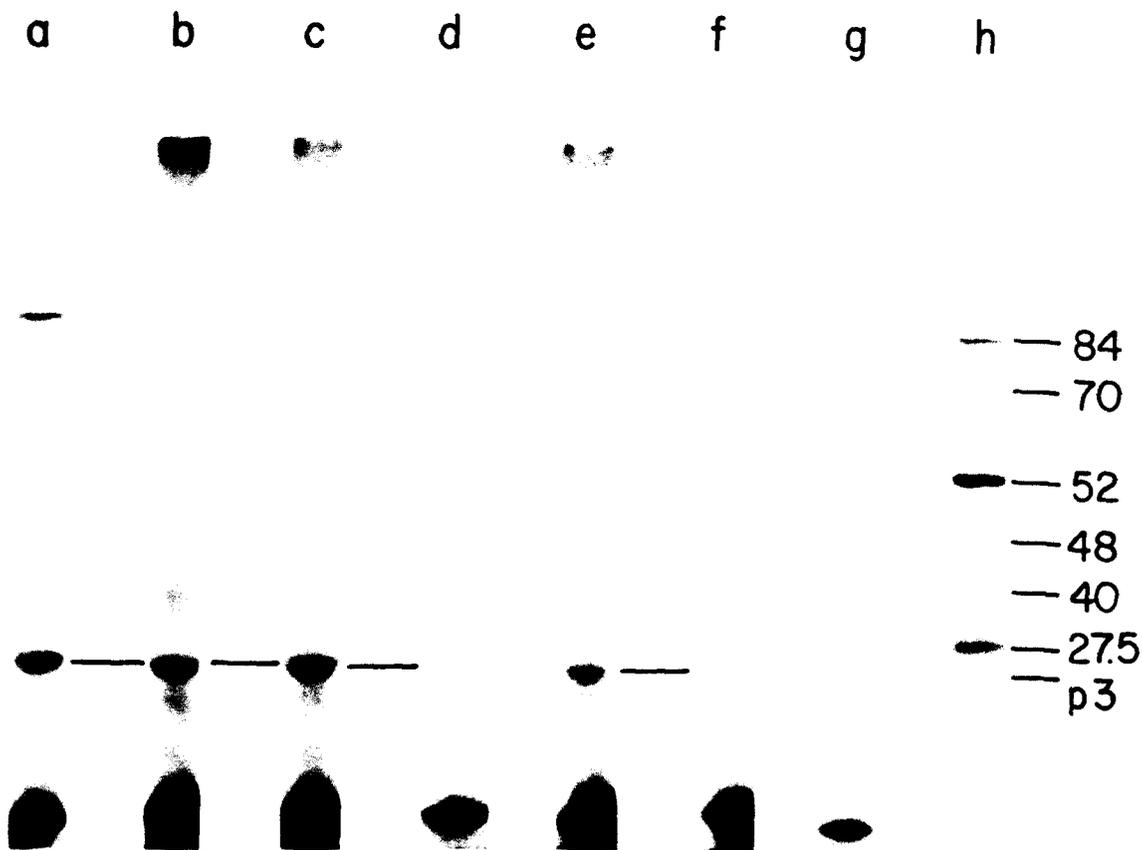


Figura 7. Efecto de una mutación ts en el gen 2 viral sobre la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP. Extractos de B. subtilis infectada a 30°C ó a 44°C con el mutante ts2(98) : fracción-S40, se incubaron a 30°C durante 20 minutos con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP, ATP y p3-DNA (excepto cuando se indique), como se describe en Métodos (20.1). Cuando se indica se añadió extracto de B. subtilis infectada con el mutante sus3(91) : fracción de DEAE. Después del tratamiento con nucleasa de micrococo las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y a autorradiografía. Canales : a. ts2(98)-30°C;

b. ts2(98)-30°C + sus3(91); c. como "b" pero sin p3-DNA; d. ts2(98)-44°C ; e. ts2(98)-44°C + sus3(91) ; f. como "e" pero sin p3-DNA ; g. sus3(91) ; h. marcadores de peso molecular (las cifras indican Kilodaltons).

(p3) de nueva síntesis y la del producto del gen 2 viral. Estos resultados concuerdan perfectamente con el requerimiento de ambos productos génicos en la síntesis de DNA "in vivo" y con su implicación en el proceso de iniciación (72).

1.2. Efecto de mutaciones en los genes 5, 6 y 17 virales sobre la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP

Para estudiar si, aparte de los genes 2 y 3, otros genes de Ø29 necesarios para la replicación del DNA "in vivo" estaban implicados en la formación "in vitro" del complejo de iniciación, se utilizaron, nuevamente, mutantes letales-condicionales.

Para estudiar el requerimiento del gen 5 de Ø29, y debido a no disponer de una mutación sus en ese cistrón, se utilizaron extractos de Bacillus subtilis infectada a temperatura restrictiva con el mutante ts5(219) : Fracción-S40. Teniendo en cuenta la posibilidad de que la proteína p5 ts, sintetizada en condiciones restrictivas y por tanto desnaturalizada, pudiera recuperar su forma y actividad nativa por renaturalización durante los 20 minutos a una temperatura de 30°C, que son las condiciones del ensayo de iniciación "in vitro" utilizadas rutinariamente, estos extractos se probaron en la formación del complejo p3-dAMP en un ensayo de iniciación "in vitro" realizado a diferentes temperaturas (37°C, 40°C y 42°C) y, comparativamente,

se utilizó una fracción equivalente de células infectadas con Ø29 tipo salvaje.

Como se observa en la Figura 8, la fracción de células infectadas a temperatura restrictiva con el mutante ts5(219) fué activa en catalizar la formación del complejo de iniciación p3-dAMP en ensayos "in vitro" realizado tanto a temperaturas permisivas como restrictivas (canales a al c), en un grado comparable a la actividad presente en los extractos infectados con Ø29 tipo salvaje. Hay que notar que, en ambos casos, la actividad decae con la elevación de la temperatura del ensayo, si bien en un grado similar.

Por tanto, los resultados indican que el producto del gen 5 no se requiere para la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP. Sin embargo y como se describirá en la Discusión, esta conclusión, debido al carácter de este mutante, ha de tomarse con ciertas reservas.

Para estudiar el requerimiento de los genes 6 y 17 virales se preparó, en ambos casos, fracción de PEG a partir de extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus6(626) ó con el mutante sus17(741). Posteriormente, el extracto correspondiente a cada mutante se ensayó en la reacción de iniciación "in vitro".

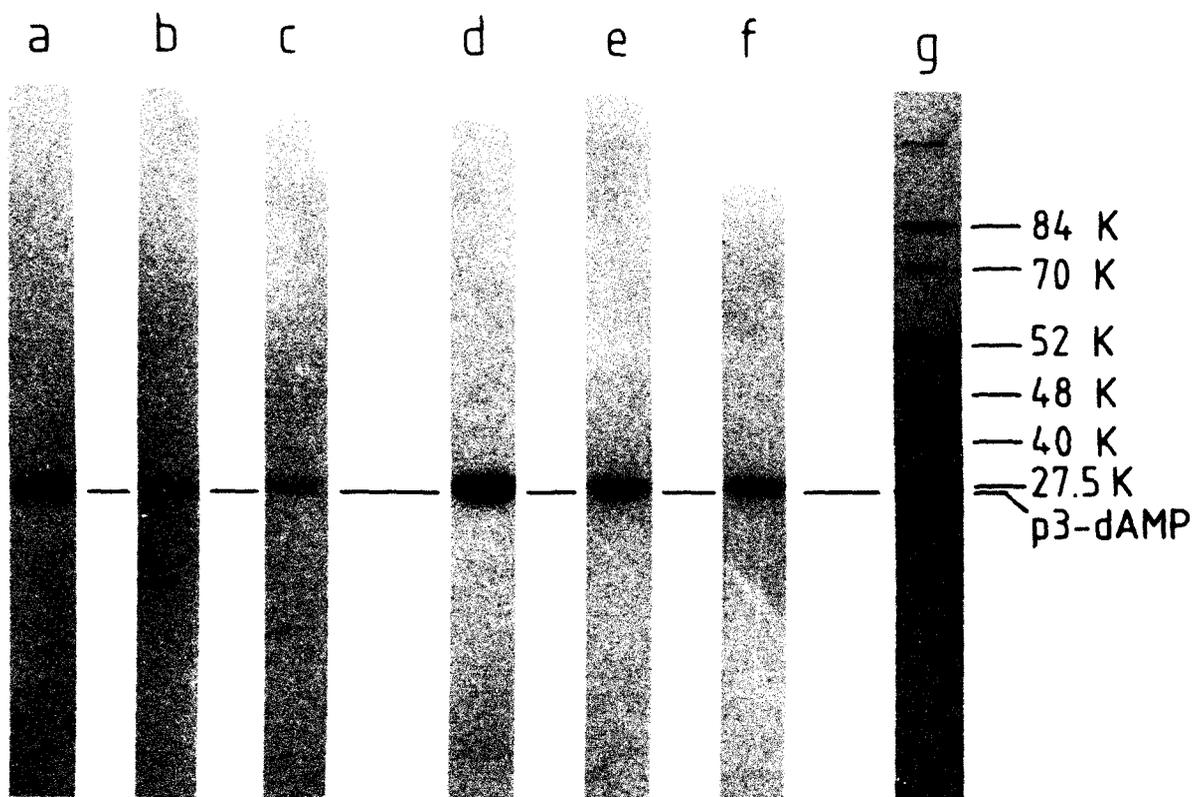


Figura 8. Efecto de una mutación ts en el gen 5 viral sobre la formación del complejo de iniciación p3-dAMP. Extractos de B. subtilis infectada a 42°C con el mutante ts5(219) : fracción-S40 ó con Ø29 tipo salvaje : fracción-S40, se incubaron a diferentes temperaturas (37°C, 40°C y 42°C) con { α -³²P}-dATP, ATP y p3-DNA, como se describe en Métodos (20.1). Después del tratamiento con nucleasa de micrococo, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, y a autorradiografía. Canales (a al c): células infectadas a 42°C por ts5(219). Canales (d al f): células infectadas a 42°C por Ø29 tipo salvaje. La temperatura del ensayo de iniciación "in vitro" fué : 37°C (canales a y d), 40°C (canales b y e) y 42°C (canales c y f). En el canal "g" se corrió una muestra de las proteínas estructurales de Ø29 marcadas con ³⁵S, como marcadores de movilidad (indicado en Kilodaltons).

La Figura 9 muestra que ambos extractos fueron activos en la formación del complejo de iniciación p3-dAMP cuando se añadió p3-DNA como molde (canales a y d). No se observó estimulación respecto al complejo formado en los canales "a" y "d" cuando se adicionó en cada caso extractos de células infectadas con el mutante sus3(91) : Fracción de DEAE (canales c y f). No hubo reacción en ausencia de molde (canales b y e), lo cual es consistente con la ausencia de síntesis de DNA viral en los extractos infectados con estos mutantes. Sin embargo cuando, para el caso del mutante sus17(741), se utilizó una fracción-S40 (menos limpia de DNA), hubo una ligera formación del complejo de iniciación en el caso de no adicionarse p3-DNA como molde. Esto puede explicarse debido a que este mutante es muy "leaky", y puede haber algo de síntesis de p3-DNA en las células infectadas por este mutante. Resultados similares a los mostrados para el caso del mutante sus17(741) se obtuvieron utilizando extractos infectados con otro mutante en el gen 17 : sus17(112) (resultados no mostrados).

Estos resultados sugieren que los productos correspondientes a los genes 6 y 17 no son requeridos para la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP. Sin embargo, el carácter "leaky" de los mutantes en el gen 17 utilizados no permite una conclusión tajante para este caso.

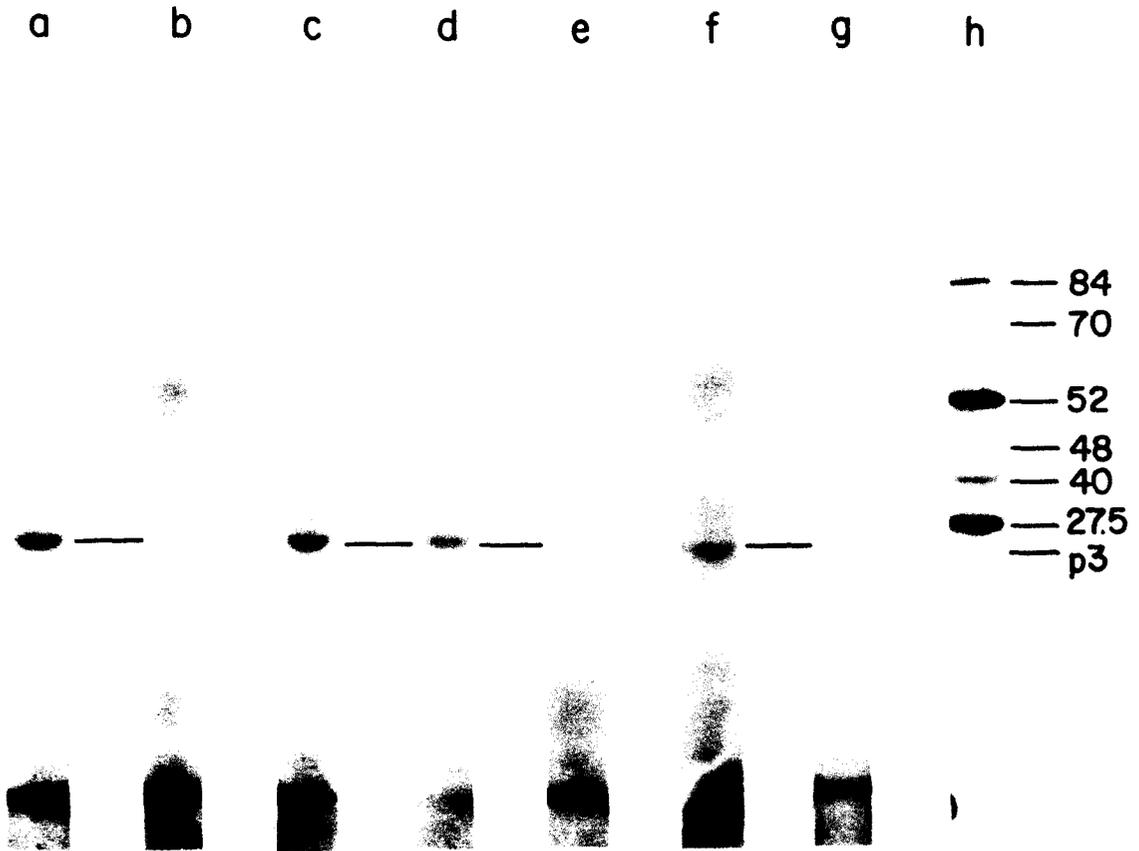


Figura 9. Efecto de una mutación sus en los genes 6 y 17 virales sobre la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP. Extractos de B. subtilis infectada con los mutantes sus6(626) ó sus17(741): fracción de PEG, se incubaron durante 20 minutos a 30°C con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP, ATP y complejo p3-DNA (excepto donde se indique), como se describe en Métodos (20.1). Cuando se indique, se añadió extracto de B. subtilis infectada con el mutante sus3(91) : fracción de DEAE. Después del tratamiento con nucleasa de micrococo las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, y a autorradiografía. Canales : a. sus6(626); b. sus6(626) sin añadir p3-DNA; c. sus6(626) + sus3(91); d. sus17(741); e. sus17(741) sin añadir p3-DNA; f. sus17(741) + sus3(91); g. sus3(91); marcadores de peso molecular (las cifras indican Kilodaltons).

1.3. Efecto de inhibidores de la replicación, transcripción y traducción sobre la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP

Para resolver la incógnita de si alguna de las funciones implicadas en la replicación del genoma bacteriano era igualmente requerida para el paso de iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$, se probó el efecto de diferentes drogas e inhibidores de la replicación, transcripción y traducción sobre la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP.

Como muestra la Tabla 1, ni el ácido nalidíxico ni la novobiocina, conocidos inhibidores de las subunidades A y B, respectivamente, de la DNA girasa (101), afectaron la formación del complejo p3-dAMP. La droga HPURa, inhibidora de la DNA polimerasa III de B. subtilis (75,102) no tuvo efecto sobre la formación del complejo p3-dAMP. Una concentración del nucleótido dideoxi-ATP en un exceso de 320 veces sobre la concentración de dATP utilizada en el ensayo de iniciación "in vitro", no inhibió la reacción de iniciación. Tampoco la rifampicina ni el cloranfenicol, inhibidores de la transcripción y traducción, respectivamente, tuvieron efecto alguno sobre la formación del complejo de iniciación.

TABLA 1. Efecto de inhibidores de la replicación, transcripción y traducción sobre la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP.

<u>Inhibidor</u>	<u>Concentración</u>	<u>Actividad, %</u>
Ninguno		100
Acido nalidíxico	100 µg/ml	106
	200 µg/ml	117
Novobiocina	50 µg/ml	95
	100 µg/ml	117
HPUra	25 µg/ml	106
	50 µg/ml	104
Dideoxi-ATP	40 µM	82
	80 µM	80
Rifamicina	10 µg/ml	105
	20 µg/ml	91
Cloranfenicol	50 µg/ml	97
	200 µg/ml	95

Extractos de B. subtilis infectada con Ø29 tipo salvaje : fracción-S40, se incubaron con { α -³²P}-ATP, ATP y p3-DNA en la presencia o ausencia de los diferentes inhibidores, como se describe en Métodos (20.1). Las bandas de p3-dAMP marcadas con ³²P, aisladas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, se cuantificaron por densitometría de las autorradiografías obtenidas por exposición del gel en condiciones lineales, y por contaje directo de la banda recortada del gel. Ambas determinaciones dieron resultados similares. El 100% de actividad corresponde a la incorporación de 0.5 fmoles de (³²P)-dAMP.

1.4. Requerimiento de ATP en la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP

Aunque el requerimiento de ATP para la formación del complejo de iniciación cuando se utilizaban extractos de Bacillus subtilis infectada con Ø29 de tipo salvaje ya había sido indicado previamente (67), nos propusimos estudiar un poco más a fondo este requerimiento en cuanto a dosis óptima, reemplazamiento por otros nucleótidos y si la formación del complejo de iniciación requiere o no hidrólisis de ATP.

Haciendo un efecto de dosis de ATP se observó que la máxima actividad se obtenía a una concentración de 1 mM (resultados no mostrados), produciéndose una estimulación de aproximadamente 20 veces sobre el control sin nucleótido.

Como se observa en la Tabla 2, el ATP puede ser reemplazado por CTP, GTP, UTP, dGTP, dCTP y TTP en la reacción de iniciación. El ADP también fue activo en la formación del complejo de iniciación aunque de una forma menos eficiente que la de los ribo- y deoxirribonucleósidos trifosfato indicados anteriormente. El AMP resultó esencialmente inactivo.

Para tratar de determinar si es o no requerida hidrólisis de ATP, se utilizaron en la reacción de iniciación "in vitro" los análogos de ATP no-hidrolizables: AMP-PNP y AMP-PCP. La actividad obtenida utilizando

TABLA 2. Efecto de ATP y otros nucleótidos en la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP.

<u>Adición</u>	<u>Concentración, mM</u>	<u>Actividad, %</u>
ATP	1	100
	0.1	49
GTP	1	75
	0.1	149
CTP	1	64
	0.1	97
UTP	1	88
	0.1	110
dGTP	1	85
	0.1	132
dCTP	1	200
	0.1	213
TTP	1	42
	0.1	120
ADP	1	42
	0.1	6
AMP	1	4
	0.1	3
AMP-PNP	1	19
	0.1	6
AMP-PCP	1	10
	0.1	6
Ninguna		4

Extractos de *B. subtilis* infectada con Ø29 tipo salvaje : fracción-S40, se pasaron a través de columnas de Sephadex G-50 para eliminar los nucleótidos endógenos y se incubaron con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP en presencia o ausencia de los diferentes nucleótidos, como se describe en Métodos (18.1.1 y 20.1). La cantidad de complejo p3-dAMP marcado, aislado por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, se cuantitativó como se describe en la Tabla 1. El 100% de actividad corresponde a la incorporación de 0.75 fmoles de (^{32}P)-dAMP.

AMP-PNP a una concentración de 1 mM fué aproximadamente un 19% de la obtenida con 1 mM ATP. El análogo no-hidrolizable AMP-PCP, ensayado a una concentración de 1 mM, fué mucho menos activo, siendo la formación del complejo de iniciación un 10% de la cantidad obtenida con 1 mM ATP y solo ligeramente superior a la reacción que tuvo lugar en ausencia de nucleótido.

2. Clonaje y expresión del gen 2 del bacteriófago Ø29

Con objeto de purificar y caracterizar la proteína p2, y debido a la baja cantidad sintetizada en células de B. subtilis infectadas con Ø29, nos planteamos el clonaje y la sobreproducción de la proteína p2 del bacteriófago Ø29.

2.1. Aislamiento y caracterización de recombinantes

El producto del gen 2 había sido caracterizado como una proteína de peso molecular 67.000 daltons (103) y probablemente correspondía a la "fase de lectura abierta" número 7 en la secuencia de la región izquierda del DNA de Ø29 (104), cuya secuencia puede codificar para una proteína de peso molecular 66.500.

Como se esquematiza en la Figura 10, se partió de la región temprana izquierda del DNA de Ø29 contenida en el fragmento de restricción Hind III-B (obtenido como se indica en Métodos (6.3)), que contiene la secuencia completa que debería corresponder al gen 2 y, además,

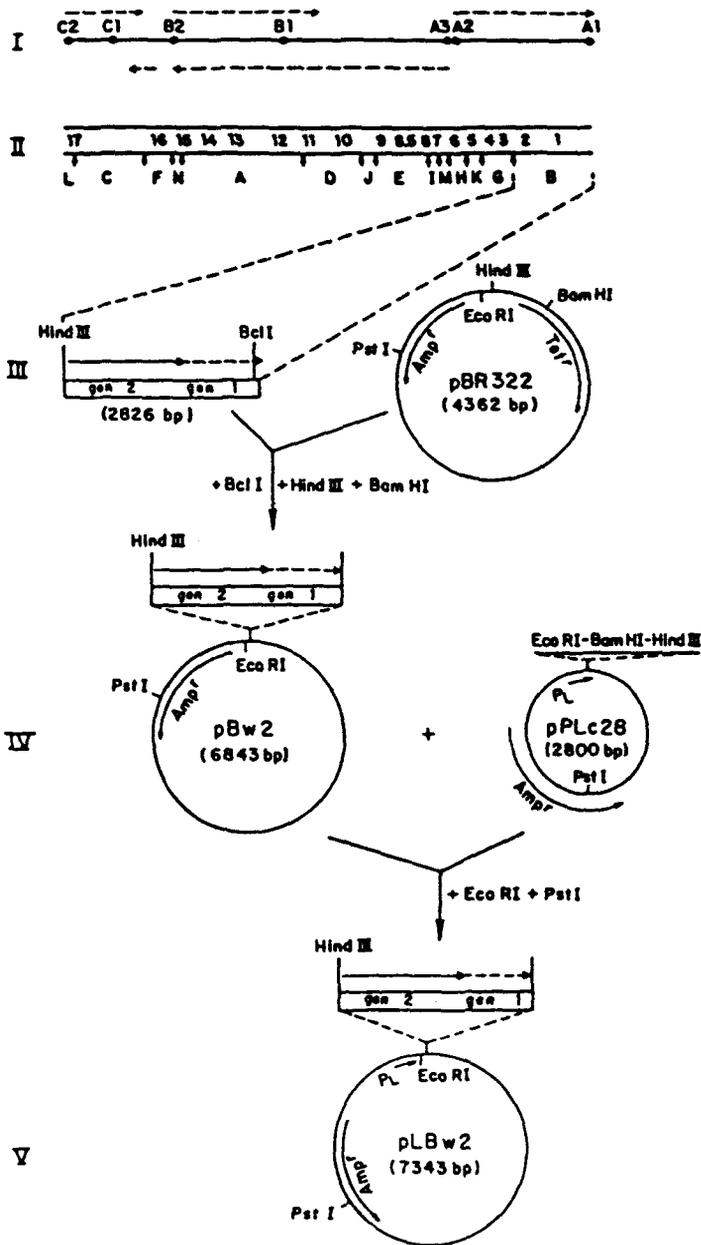


Figura 10. Construcción de un plásmido recombinante de pPLc28 conteniendo el gen 2 de $\phi 29$. I. Los puntos negros representan sitios de unión de la RNA polimerasa de *B. subtilis* sobre el DNA de $\phi 29$, y la línea de trazos representa la extensión y dirección de la transcripción temprana (parte superior) y tardía (parte inferior). El esquema está dibujado en la orientación opuesta a la descrita por Sogo y col. (32).

II. Mapa genético de DNA de $\phi 29$ dibujado en la orientación opuesta a la descrita por Mellado y col. (30). Los cortes del enzima de restricción Hind III (tomados de Yoshikawa e Ito (29)) están indicados con letras, mientras que los diferentes genes de $\phi 29$ están indicados con su número correspondiente.

III. Representación ampliada del fragmento Hind III-B del DNA de $\phi 29$, y esquema del plásmido pBR322. En esta representación y en las siguientes, las flechas continuas y discontinuas representan los tamaños y dirección de transcripción de los genes 2 y 1 de $\phi 29$, respectivamente.

IV. Esquema del plásmido recombinante pBw2 con el inserto de $\phi 29$ conteniendo el gen 2 y esquema del plásmido pPLc28.

V. Esquema del plásmido recombinante pLBw2 con el inserto de $\phi 29$, conteniendo el gen 2, situado bajo el control del promotor P_L del bacteriófago λ .

varias "fases de lectura abiertas" que pueden codificar a proteínas de pesos moleculares que oscilan entre 10.000 y 3.000 daltons (104); una de estas "fases de lectura abiertas" debería corresponder a la que codifica al producto del gen 1 (105).

El fragmento Hind III-B se digirió con el enzima de restricción Bcl-I que corta a 73 pares de bases del extremo izquierdo del DNA de $\phi 29$, con lo que eliminamos la proteína terminal unida covalentemente a este extremo 5'. Este fragmento Hind III-B/Bcl I, de aproximadamente 2.800 pares de bases, con extremos cohesivos HindIII y Bcl I/Bam HI, fué ligado al plásmido pBR322 digerido con los dos enzimas de restricción Hind III + Bam HI (ver Figura 10) en las condiciones descritas en Métodos (7.1). Los plásmidos recombinantes que poseían el fragmento de 2.800 pares de bases, conteniendo el gen 2, insertado entre los sitios Hind III y Bam HI del plásmido pBR322, en la única orientación posible, fueron seleccionados como se describe en Métodos (7.1). De esta manera se obtuvo el plásmido derivado de pBR322, conteniendo el gen 2 de $\phi 29$, denominado pBw2.

Para obtener un alto nivel de expresión de la proteína p2 nos planteamos colocar el gen 2 bajo el control transcripcional del fuerte promotor P_L del bacteriófago λ , contenido en el plásmido pPLc28 (80). Con este motivo el plásmido recombinante pBw2, descrito

anteriormente, fué digerido con los dos enzimas de restricción Eco RI + Pst I, y la mezcla resultante fué ligada al plásmido pPLc28 digerido con los tres enzimas de restricción Eco RI + Hind III + Pst I (ver Figura 10), en las condiciones descritas en Métodos (7.2). De esta manera el fragmento Eco RI/Pst I del plásmido recombinante pBw2, conteniendo el gen 2, pudo ser ligado al fragmento Eco RI/Pst I del plásmido pPLc28 en la única orientación posible que sitúa los genes 2 y 1 bajo el control del promotor P_L . Este nuevo plásmido recombinante, seleccionado como se describe en Métodos (7.2), se denominó pLBw2.

2.2 Síntesis de proteínas dirigida por el plásmido recombinante pLBw2

Puesto que la producción incontrolada de altos niveles de las proteínas codificadas por los plásmidos recombinantes podría ser perjudicial para la bacteria se eligió como huésped la estirpe de E. coli K-12 Δ H1 Δ trp. Esta estirpe de E. coli es un lisógeno del bacteriófago λ que posee la mutación sensible a temperatura cI857 en el gen del represor del promotor P_L de este bacteriófago. De esta manera, la expresión que dependa del promotor P_L contenido en estos plásmidos se encontrará bloqueada en el caso de mantener las células K-12 Δ H1 Δ trp a una temperatura de 30°C, debido a la actividad del

represor, mientras que al subir la temperatura a 42°C el represor (que en este caso es termosensible), dejará de funcionar, activándose la transcripción que está bajo el control del promotor P_L.

Por lo tanto, se transformó directamente células de E. coli K-12ΔH1Δtrp con los plásmidos pLBw2 o pPLc28, como se indica en Métodos (8); posteriormente estas células se crecieron a 30°C en medio LB + ampicilina hasta A₄₂₀ = 0.46 y se cambiaron a medio mínimo como se indica en Métodos (10). A distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos) después de la incubación a 42°C, se marcaron las bacterias con ³⁵S metionina, se analizaron y se procesaron como se indica en Métodos (10).

Como se muestra en la Figura 11, solamente en las células transformadas con el plásmido recombinante conteniendo el gen 2 se observó la presencia de un polipéptido marcado, de 68.000 daltons de masa molecular, que representaba un 2%, aproximadamente, de la proteína que se sintetizaba "de novo" después de 60 minutos a partir de la inducción a 42°C.

En estas células se marcaron, además del polipéptido de 68.000 daltons, 2 polipéptidos de 5.800 y 3.400 daltons y un polipéptido de masa molecular menor de 2.000 daltons, que se marcó a 30 y a 60 minutos a partir de la inducción, pero no a tiempos posteriores. Estos tres polipéptidos inducidos en E. coli transformada por

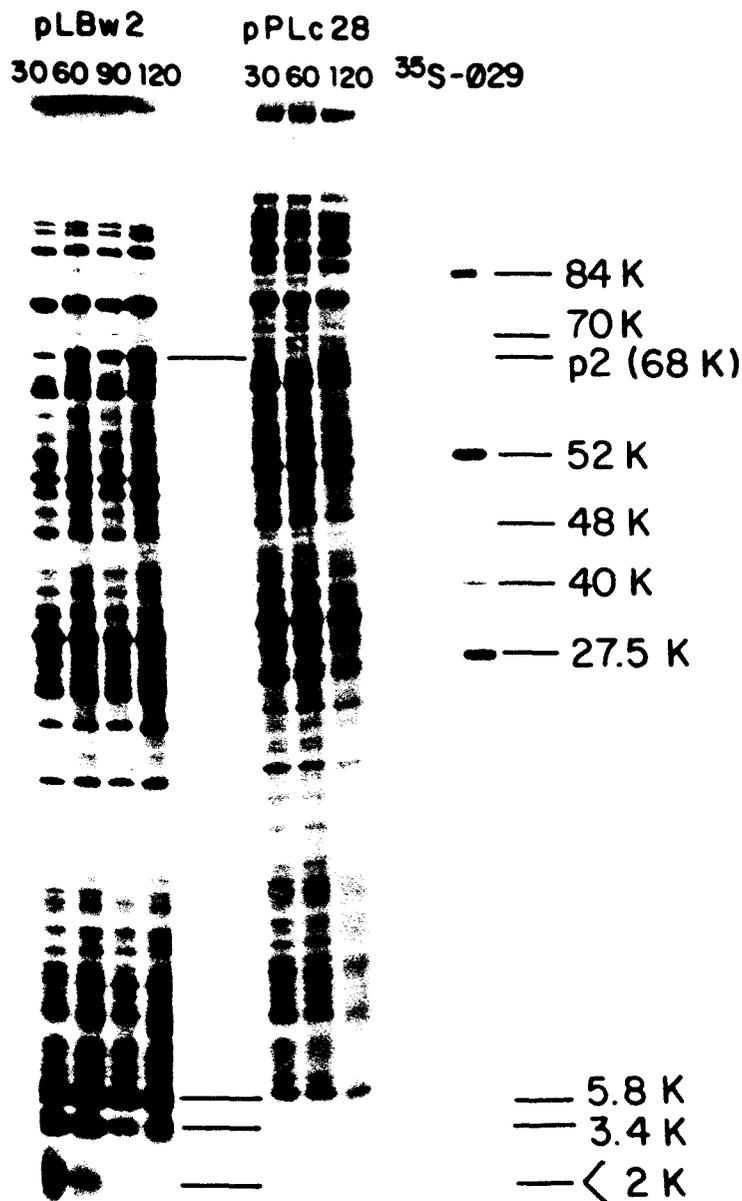


Figura 11. Análisis electroforético y autorradiografía de las proteínas inducidas en E. coli por el plásmido recombinante pLBw2. Células de E. coli K-12ΔH1Δtrp transformadas con el plásmido recombinante pLBw2 ó con el plásmido control pPLc28, se crecieron a 30°C y, a los tiempos indicados después de subir la temperatura a 42°C, se marcaron con (³⁵S)-Metionina y se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, como se describe en Métodos (10). Sobre cada canal electroforético se indica el "tiempo cero" de cada período de marcaje (indicado en minutos). En el margen derecho se especifican las masas moleculares (en Kilodaltons) de las proteínas estructurales de Ø29 y las de las proteínas inducidas por el plásmido recombinante pLBw2.

el plásmido pLBw2 representaban un 3%, 9% y 5%, respectivamente, de la proteína sintetizada "de novo" después de 60 minutos a partir de la inducción.

Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizaron células de E. coli NF2690 transformadas directamente con el plásmido recombinante conteniendo el gen 2, pLBw2 (resultados no mostrados).

2.3. Estabilidad de las proteínas inducidas en E. coli transformada con el plásmido recombinante pLBw2

La estabilidad de las proteínas inducidas en E. coli por el plásmido pLBw2 fué examinada realizando un experimento de "pulso y caza" en el que se determinó el grado de estabilidad de la proteína marcada en un pulso con (³⁵S)-metionina, al cabo de diferentes períodos de incubación en presencia de un exceso de metionina "fría", como se indica en Métodos (10).

Como se muestra en la Figura 12, la proteína p2 y el polipéptido de 5.800 daltons de masa molecular fueron bastante estables, manteniéndose en cantidad apreciable después de una caza de 2 horas. Sin embargo, los polipéptidos de 3.400 y 2.000 daltons fueron menos estables, y solo aproximadamente el 50% y el 10%, respectivamente, del material marcado permaneció después de 2 horas de caza.

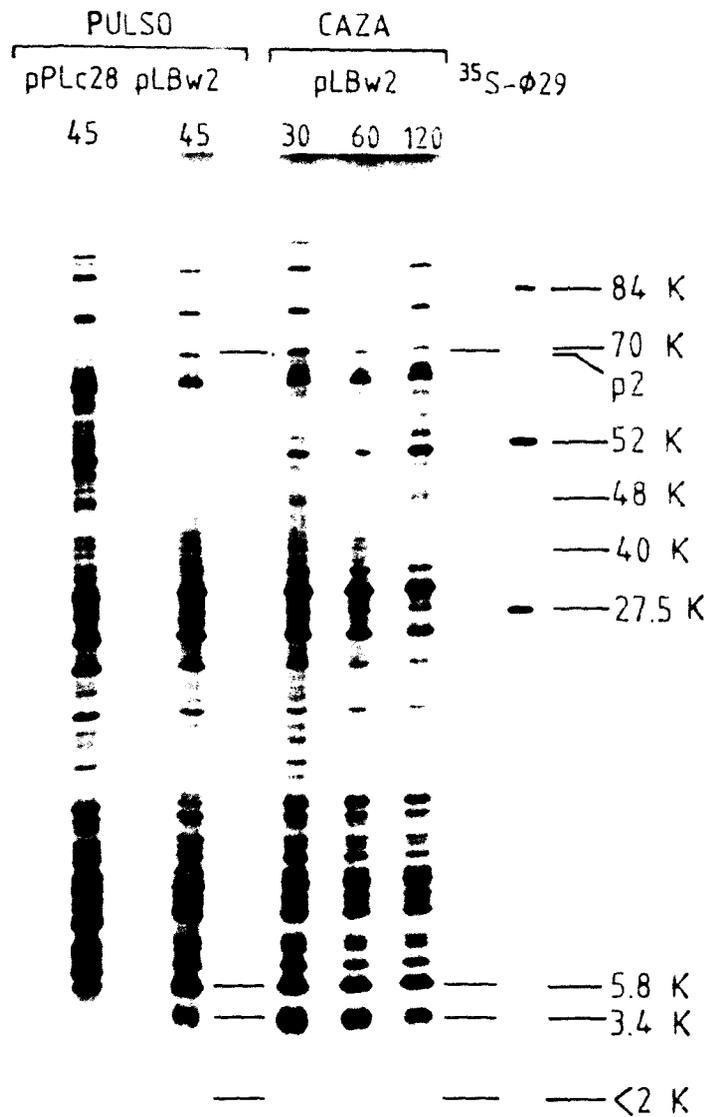


Figura 12. Estabilidad de las proteínas inducidas en *E. coli* transformada por el plásmido recombinante pLBw2. Células de *E. coli* K-12ΔH1Δtrp conteniendo el plásmido recombinante pLBw2 ó el plásmido control pPLc28 fueron inducidas a 42°C y, después de 45 minutos, se marcaron con (³⁵S)-Metionina. Las proteínas marcadas en las células transformadas con el plásmido recombinante pLBw2 fueron "cazadas" con un exceso de Metionina "fría", tomándose alícuotas después de 30, 60 y 120 minutos y

sometiéndolas a electroforesis en geles de SDS-poli-acrilamida como se describe en Métodos (17.1). Sobre cada canal electroforético se indicará el "tiempo cero" del "pulso" o bien los tiempos (en minutos) a los que se tomaron alícuotas correspondientes a la "caza". En el margen derecho se especifican las masas moleculares (en Kilodaltons) de las proteínas estructurales de Ø29 y las de las proteínas inducidas por el plásmido recombinante pLBw2.

2.4. Formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP con proteína p2 sintetizada en E. coli

Una de las proteínas inducidas en E. coli transformada por el plásmido recombinante conteniendo el gen 2, pLBw2, tenía el peso molecular esperado para el producto de este gen. Si la proteína de 68.000 daltons sintetizada en E. coli era realmente p2, debería ser activa en la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP al adicionar estos extractos de E. coli a extractos de B. subtilis infectada con un mutante sus2 de Ø29, que como vimos en el apartado de Resultados (1.1), eran incapaces de catalizar la reacción de iniciación debido a la ausencia de proteína p2.

Con esta idea, extractos de E. coli transformada por el plásmido recombinante pLBw2 se probaron en la formación "in vitro" del complejo de iniciación en un ensayo de complementación utilizando extractos de B. subtilis infectada con un mutante sus de Ø29 en el cistrón 2.

Como se observa en la Figura 13, ninguno de los dos extractos por sí solos fueron activos (canales a y b); Sin embargo cuando se adicionaron los dos extractos de E. coli y B. subtilis, en presencia de complejo p3-DNA de Ø29 como molde, hubo formación de complejo de iniciación p3-dAMP (canal c). De acuerdo con resultados anteriores (67), la eliminación del molde supuso también

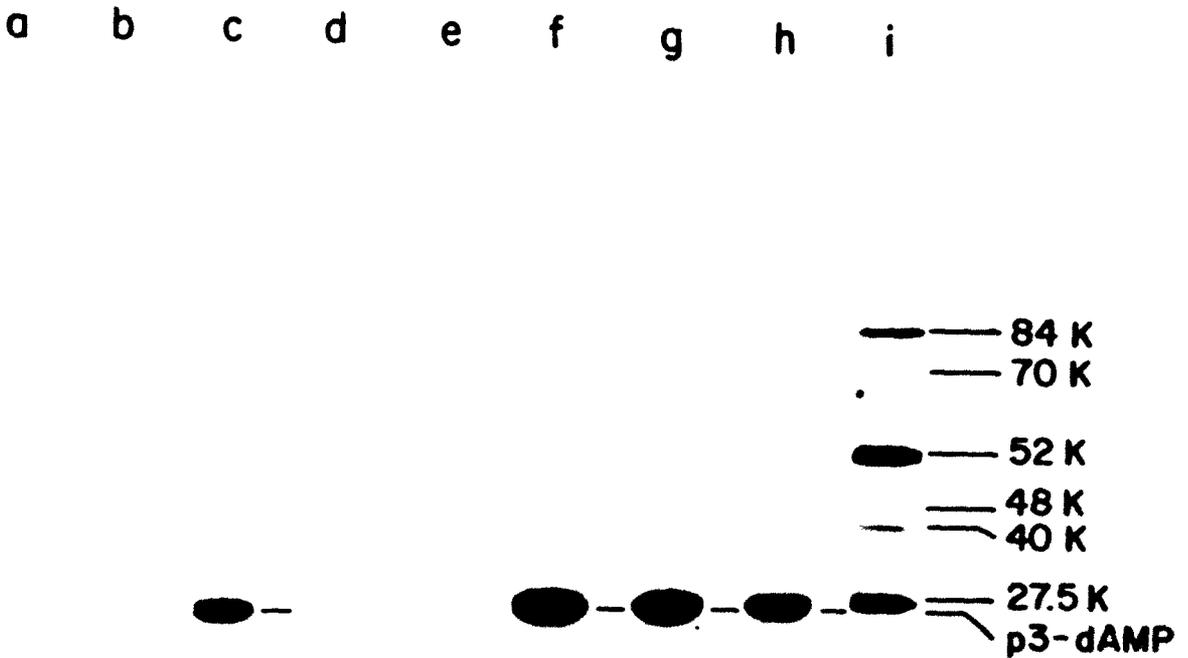


Figura 13. Formación del complejo de iniciación p3-dAMP con proteína p2 sintetizada en E. coli. Extractos de E. coli K-12 Δ H1 Δ trp transformada por los plásmidos pLBw2, pKC30 A1 ó pKC30 A12, y extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2(513) de ϕ 29 fueron preparados e incubados como se describe en Métodos (5.2, 5.13 y 20.2), para la formación del complejo de iniciación p3-dAMP en presencia de p3-DNA de ϕ 29 como molde. Canales : a. extracto sus2; b. extracto pLBw2; c. extracto sus2 + extracto pLBw2; d. como en "c" pero sin p3-DNA como molde; e. extracto sus2 + extracto pPLc28; f. extracto pKC30 A1 + extracto pLBw2; g. extracto pKC30 A12 + extracto pLBw2, h. proteína p3 purificada + extracto pLBw2; i. proteínas estructurales de ϕ 29 marcadas con 35 S, como marcadores electroforéticos de masa molecular (expresada en Kilodaltons).

en este caso la pérdida de actividad (canal d). Como control de especificidad, extractos de E. coli transformados con el plásmido control pPLc28, fueron inactivos cuando se complementaron con los extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2 de Ø29 (canal e).

Por tanto, y como se deduce de su actividad en la reacción de iniciación, los extractos de E. coli transformada con el plásmido pLBw2 sintetizan proteína p2 biológicamente activa.

En la Figura 13 se observa también que estos extractos de E. coli conteniendo proteína p2, dieron lugar a la formación "in vitro" del complejo de iniciación cuando se complementaron con extractos de E. coli transformada por el plásmido pKC30 A1 (76) que contiene, además del gen 3 de Ø29, los genes 4 y 5, implicados en el control de la transcripción tardía (106) y en la replicación del DNA viral (107), respectivamente (canal f). En este caso, la cantidad de complejo p3-dAMP formado fué superior (canal f) a la obtenida con los extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2 de Ø29 (canal c), debido probablemente al hecho de que la cantidad de p3 (requerimiento indispensable de esta reacción, según se demostró anteriormente) es menor en los extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2, que en los extractos de E. coli conteniendo el

plásmido sobreproductor de p3, pKC30 A1 (97).

Cuando, en lugar de los extractos de E. coli transformada con el plásmido pKC30 A1, se utilizaron aquellos transformados por el plásmido pKC30 A12, que contiene sólo los genes virales 3 y 4 (76), la formación del complejo de iniciación ocurrió (canal g) a un nivel similar al obtenido en el caso de los extractos conteniendo el plásmido pKC30 A1, lo que corrobora resultados anteriores que sugerían la no implicación del producto del gen 5 en la reacción (Ver Resultados (1.2)).

Por último, cuando se complementaron extractos de E. coli transformada por el plásmido recombinante pLBw2 (dadores de p2), con proteína p3 purificada, también hubo formación del complejo de iniciación p3-dAMP (canal h).

3. Purificación y caracterización de la proteína p2 como una DNA polimerasa

Los resultados que se presentan a continuación demuestran que la proteína p2, además de su actividad en la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$, posee intrínsecamente asociada una actividad DNA polimerasa que fué especialmente activa con el molde "primer" sintético poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈.

3.1. Actividad DNA polimerasa asociada a la proteína p2

Debido al papel de la proteína p2 en la iniciación de la replicación del DNA de Ø29 y a la disponibilidad de un sistema "in vitro" que requiere la presencia de proteína p2 biológicamente activa para la formación del complejo de iniciación p3-dAMP, se utilizó este ensayo de actividad para seguir la proteína p2 a lo largo de los diferentes pasos de purificación. Por otra parte, y como se indicó anteriormente en Resultados (2.2), únicamente en las células de E. coli transformadas con el plásmido pLBw2 (conteniendo el gen 2), y no en las células transformadas con el plásmido "control", pPLc28, se indujo una proteína con el peso molecular esperado (68.000 daltons) para la proteína p2, por lo que pensamos que sería igualmente útil emplear paralelamente extractos "control" en los primeros pasos de purificación.

De esta manera, la proteína p2 podría ser detectada no sólo por su actividad en la reacción de iniciación "in vitro", sino también comparando ambos extractos por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Siguiendo esta estrategia se prepararon extractos de E. coli K-12ΔH1Δtrp transformada con el plásmido recombinante conteniendo el gen 2, pLBw2, o con el plásmido "control", pPLc28, mediante lisis mecánica con alúmina como se describe en Métodos (5.2). Estos extractos se

precipitaron posteriormente con sulfato amónico y, la fracción de proteína que precipitó entre el 45% y el 60% de saturación, se pasó a través de columnas de AD-agarosa como se describe en Métodos (18.1.3).

Las diferentes fracciones obtenidas a partir de los extractos "conteniendo p2" o de los extractos "control", fueron analizadas por electroforesis en placas de gel conteniendo un gradiente entre el 10% y el 20% de acrilamida en presencia de SDS, como se describe en Métodos (17.1.2). Asimismo, la presencia o ausencia de proteína p2 en las diferentes fracciones se analizó por formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP, en un ensayo de complementación con extractos de E. coli transformada con el plásmido recombinante, conteniendo el gen 3, pKC30 A1, como se describe en Métodos (20.2).

En la Figura 14A se muestra un análisis electroforético de las distintas fracciones obtenidas, observándose claramente la presencia de una proteína con la movilidad electroforética esperada para la proteína p2, en la fracción eluida con ClNa 0.5 M de la columna de AD-agarosa "conteniendo el producto del gen 2" (indicado con el signo +), no observándose esta banda en la fracción correspondiente de la columna "control" (indicado con el signo -). El resto de las bandas presentes en la fracción eluida con ClNa 0.5 M, así como en el resto de las fracciones, fueron similares en las muestras

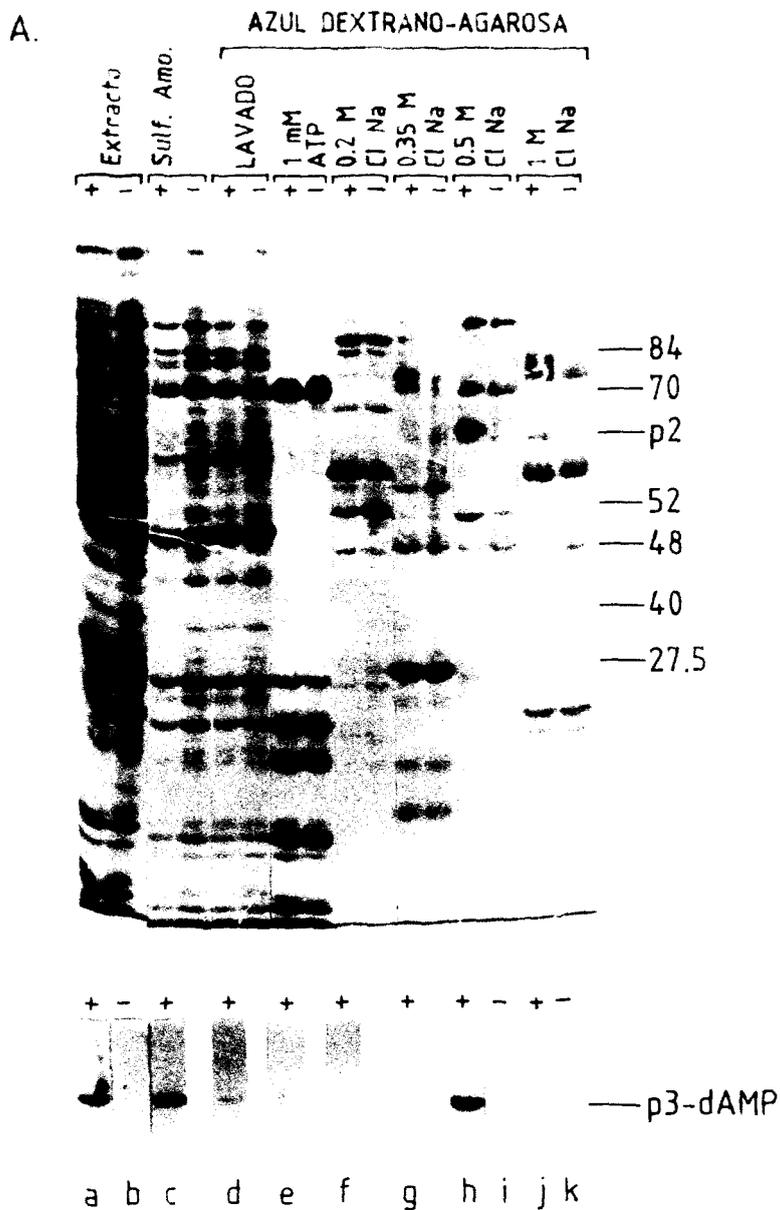


Figura 14. Actividad de iniciación asociada a una fracción, parcialmente purificada, de proteína p2. Parte A. Extractos de células de E. coli K-12 Δ H1 Δ trp transformadas con el plásmido recombinante, conteniendo el gen 2, pLBw2, ó con el plásmido "control", pPLc28, fueron preparados por lisis con alúmina y parcialmente purificados por precipitación con sulfato amónico entre

el 45% y el 60% de saturación seguido de cromatografía en AD-agarosa, como se describe en Métodos (5.2.2 y 18.1.3). Las fracciones protéicas, en las diferentes etapas de purificación, se sometieron a electroforesis en placas conteniendo un gradiente de acrilamida entre el 10% y el 20% en presencia de SDS, siendo teñidas posteriormente. Los signos (+) y (-) indican fracciones de extractos "conteniendo el gen 2" y "control", respectivamente. La cantidad de proteína utilizada en el análisis electroforético de las diferentes fracciones fué como se describe a continuación : extracto (65 µg); 45%-60% sulfato amónico (21 µg); lavado (25 µg); eluato ATP 1 mM (50 µg); eluato ClNa 0.2 M (13 µg); eluato ClNa 0.35 M (13 µg); eluato ClNa 0.5 M (9 µg); eluato ClNa 1 M (15 µg). A la derecha se indica la movilidad electroforética de las proteínas estructurales de Ø29 (las cifras indican Kilodaltons), así como la movilidad esperada para la proteína p2.

Parte B. Las diferentes fracciones indicadas anteriormente fueron utilizadas como dadoras de proteína p2 en un ensayo de complementación con extractos de E. coli transformada con el plásmido recombinante, conteniendo el gen 3 de Ø29, pKC30 A1, con objeto de analizar la formación del complejo de iniciación p3-dAMP, como se describe en Métodos (20.2). Al igual que en la parte A, los signos (+) y (-) indican fracciones "conteniendo el gen 2" y "control", respectivamente. Canales : a y b. extracto (32 µg); c. 45%-60% sulfato amónico (3.5 µg); d a j. columna de AD-agarosa; d. lavado (10 µg); e. eluato ATP 1 mM (0.5 µg); f. eluato ClNa 0.2 M (0.7 µg); g. eluato ClNa 0.35 M (0.1 µg); h e i. eluato ClNa 0.5 M (0.08 µg); j y k. eluato ClNa 1 M (0.13 µg). A la derecha se indica la movilidad electroforética del complejo de iniciación p3-dAMP.

"conteniendo el gen 2" (+) y en las muestras "control" (-).

En la parte B de la Figura se muestra la actividad de iniciación de las diferentes fracciones. Únicamente los extractos de E. coli transformada con el plásmido pLBw2 (canal a), pero no con el plásmido "control", pPLc28, (canal b), fueron activos en la formación del complejo de iniciación p3-dAMP cuando se complementaron con extractos de E. coli transformada con el plásmido recombinante, conteniendo el gen 3 de Ø29, pKC30 A1, como se ha descrito anteriormente en Resultados (2.4). Esta actividad de iniciación presente en los extractos "conteniendo el gen 2" (+), fué precipitada con sulfato amónico entre el 45% y el 60% de saturación (canal c), eluyendo mayoritariamente de la columna de AD-agarosa con ClNa 0.5 M (canal h); un ligero residuo de actividad fué posteriormente eluido con ClNa 1 M (canal f). Ninguna de las fracciones "control" (-) ensayadas, presentó actividad en la reacción de iniciación "in vitro" (canales b, i y k).

Estos resultados mostraban la asociación entre la actividad de iniciación "in vitro" y la presencia de una banda electroforética de 68.000 daltons, correspondiente al peso molecular esperado para la proteína p2, confirmando resultados anteriores obtenidos con extractos menos purificados.

Ahora bien, cuando se analizó la distribución en las columnas de AD-agarosa de la actividad DNA polimerasa presente en los extractos (+ y -), utilizando el molde "primer" sintético poly(dA)(dT)₁₂₋₁₈ según se describe en Métodos (20.4), se observó, tal como se esquematiza en la Figura 15A, que al igual que la actividad de iniciación, una actividad DNA polimerasa específica estaba presente mayoritariamente en la fracción eluída con ClNa 0.5 M y residualmente en la eluída con ClNa 1 M de la columna de AD-agarosa correspondiente al extracto "conteniendo proteína p2". Esta actividad DNA polimerasa no se detectó en las fracciones correspondientes de la columna "control" (Figura 15B). Como también se observa en la Figura 15, el resto de la actividad DNA polimerasa estuvo presente, en un grado similar, en las fracciones correspondientes al lavado de ambas columnas de AD-agarosa.

Por tanto, el hecho de que la fracción eluída con ClNa 0.5 M de la columna de AD-agarosa correspondiente únicamente a los extractos de E. coli transformada con el plásmido pLBw2, que contenía una proteína con la movilidad electroforética de la proteína p2 y era activa en la reacción de iniciación "in vitro", tuviera además actividad DNA polimerasa, sugería que esta actividad formaba parte intrínseca de la proteína p2.

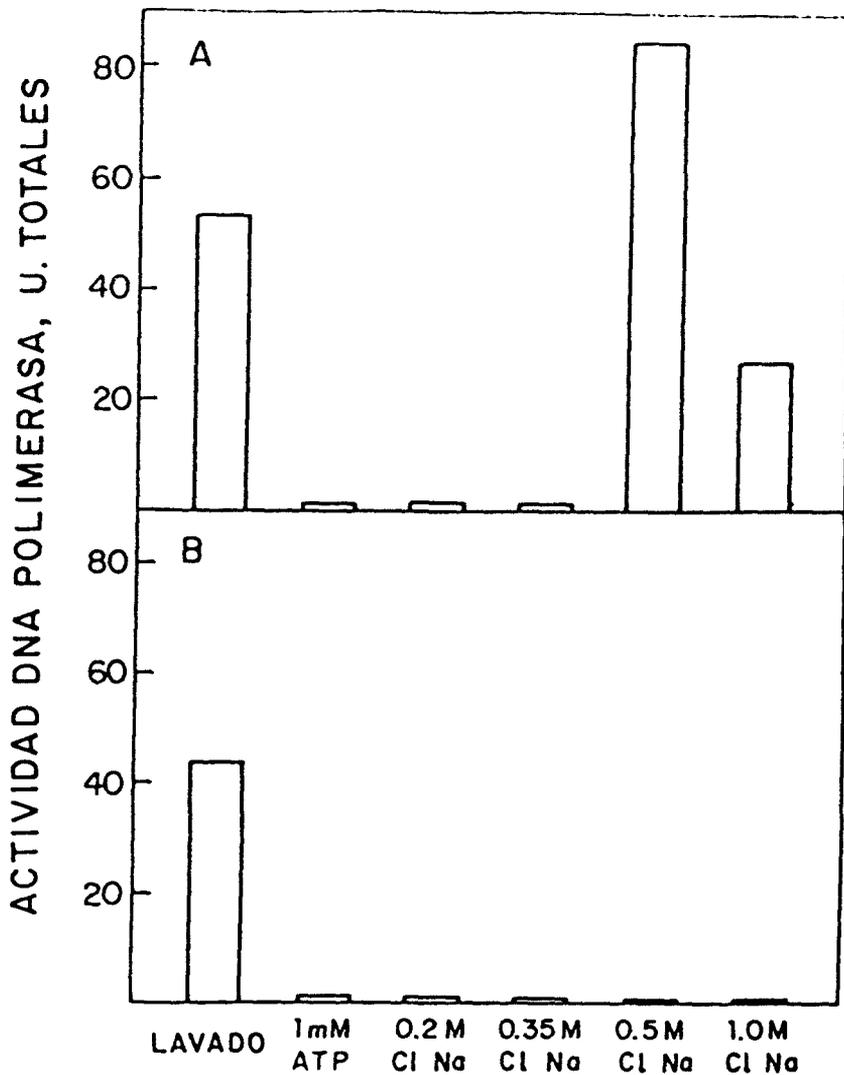


Figura 15. Actividad DNA polimerasa asociada a una fracción, parcialmente purificada, de proteína p2. Extractos de *E. coli* K-12 Δ H1 Δ trp transformada por el plásmido conteniendo el gen 2 de ϕ 29, pLBw2 (Parte A), o por el plásmido "control", pPLc28 (Parte B), se sometieron a cromatografía de afinidad en columnas de AD-agarosa, como se describe en la Figura 14. En la figura se representa la actividad DNA polimerasa, ensayada con el molde poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈, de las diferentes fracciones obtenidas. Hemos definido la unidad de actividad

DNA polimerasa como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 nmol de (d)TMP en material insoluble en ácido, durante 10 minutos a 30°C.

3.2. Ensayo de renaturalización "in situ" : La DNA polimerasa es una proteína de 68.000 daltons

Para demostrar que la actividad DNA polimerasa, presente en la fracción eluida con ClNa 0.5 M de la columna de Azul-Dextrano Agarosa correspondiente a los extractos "conteniendo proteína p2", estaba realmente asociada a esta proteína viral, y no era debida a la presencia de alguna otra proteína que se asociase específicamente a la proteína p2 durante la cromatografía en AD-agarosa, se utilizó una técnica que permite asignar la actividad polimerásica a una banda concreta, separada en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Este método, denominado "análisis de actividad "in situ" ", combina el alto poder de resolución de la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, con un ensayo para determinar la actividad "in situ", previa renaturalización de las diferentes proteínas presentes en el gel.

Para este ensayo, realizado como se indica en Métodos (20.5), se utilizaron las fracciones eluidas con ClNa 0.5 M correspondientes a las columnas de AD-agarosa (+) y (-) descritas anteriormente así como el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E. coli, utilizado como control de actividad y marcador electroforético.

Las muestras se sometieron a electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida-SDS conteniendo DNA activado; posteriormente se eliminó el SDS del gel con lo que se permitió la renaturalización de las proteínas, ahora separadas en función de su peso molecular, y se incubó el gel en una mezcla de reacción para DNA polimerasa. Después de precipitar con TCA el material marcado con ^{32}P , polimerizado "de novo", se lavó el nucleótido no incorporado y el gel se secó y sometió a autorradiografía en las condiciones indicadas en Métodos (16).

La Figura 16 muestra el resultado de este experimento : la actividad DNA polimerasa que estaba presente en la fracción eluída con ClNa 0.5 M de la columna de AD-agarosa "conteniendo proteína p2" (+), fué detectada como una banda de actividad correspondiente a la movilidad electroforética de una proteína de 68.000 daltons (canal a), no detectándose en el caso de utilizar la fracción equivalente de la columna "control" (-), (canal b). En ambos casos (canales a y b) se observa la banda de actividad "control" correspondiente al fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E. coli.

Por tanto, este resultado demuestra de forma concluyente que la proteína p2 posee intrínsecamente

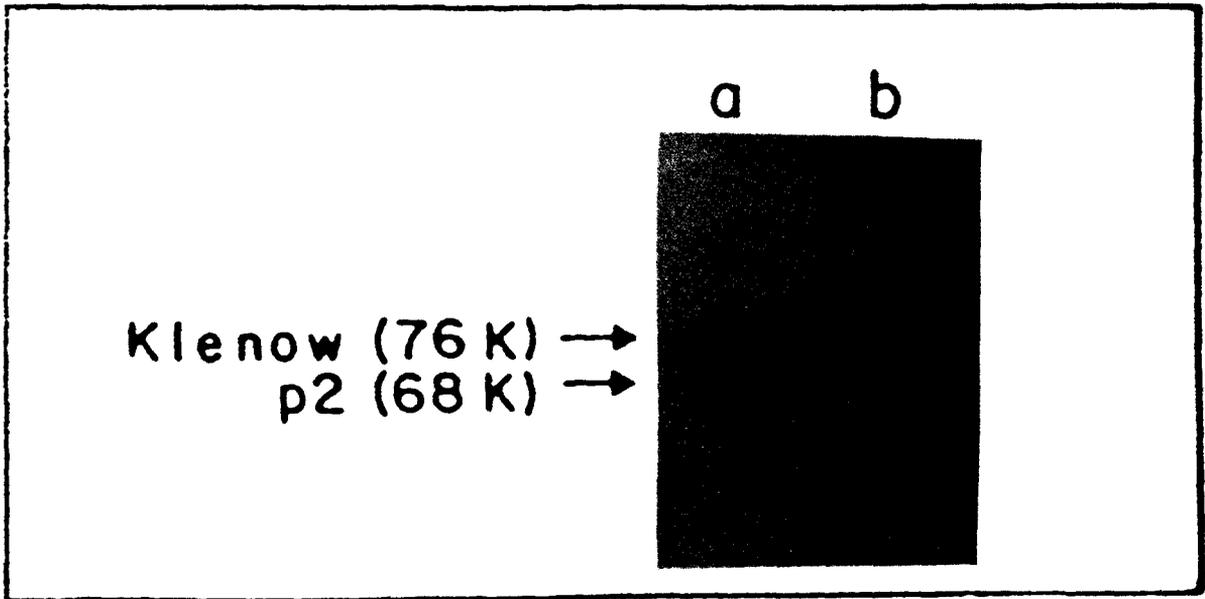


Figura 16. Análisis "in situ" de actividad DNA polimerasa. Las fracciones eluidas con ClNa 0.5 M de las columnas de AD-agarosa correspondientes a los extractos "conteniendo proteína 2" (canal a) ó a los extractos "control" (canal b), obtenidas como se indicó anteriormente en Resultados (3.1), fueron ensayadas "in situ" como se describe en Métodos (20.5). La posición esperada para la proteína p2, así como la del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E. coli (determinada por su actividad en el ensayo "in situ") están indicadas con flechas. Las cifras entre paréntesis representan el peso molecular de estas proteínas, indicado en Kilodaltons.

asociada una actividad DNA polimerasa, ya que las condiciones desnaturalizantes de la separación electroforética utilizada descartan la posibilidad de que la proteína p2 sea una subunidad catalítica o modificadora de alguna DNA polimerasa de la célula huésped.

3.3. Purificación de la proteína p2

Con objeto de purificar la proteína p2 y para favorecer la detección de su actividad DNA polimerasa, modificamos ligeramente el método de preparación de los extractos. Se ha descrito la posibilidad de eliminar casi totalmente las DNA polimerasas II y III de E. coli mediante fraccionamiento de los extractos crudos con polietilenglicol-dextrano como se describe en Métodos (5.1.3) : estos enzimas son atrapados específicamente en la telilla formada en el paso de eliminación del polietilenglicol (108); de esta manera, extractos de E. coli transformada con el plásmido pLBw2, preparados por este método, contendrían como únicas DNA polimerasas la DNA polimerasa I de E. coli y la proteína p2 de $\phi 29$ puesto que, como se vió anteriormente, extractos de B. subtilis infectada con $\phi 29$, preparados por fraccionamiento con polietilenglicol/dextrano, son muy activos en la formación "in vitro" del complejo p3-dAMP, lo cual garantiza la presencia de proteína p2 en estos extractos.

Por otra parte, una alícuota de las células de E. coli conteniendo el plásmido pLBw2, utilizadas para la purificación, fué inducida en presencia de metionina marcada con ^{35}S , tal y como se describe en Métodos (10). De esta manera, adicionando esta alícuota marcada con ^{35}S al resto de las células que se utilizaran en la purificación podríamos detectar las bandas correspondientes a la proteína p2 y a los otros 3 péptidos inducidos específicamente por el plásmido pLBw2 (ver Resultados (2.2)), por autorradiografía de los análisis electroforéticos de las distintas fracciones de purificación. Paralelamente, el hecho de disponer de una fracción marcada radioactivamente, facilita el seguimiento, localización y elección de fracciones en los distintos pasos de purificación, mediante determinación directa de radioactividad total, como se describe en Métodos (15.1).

Por tanto, los métodos de detección de la proteína p2 a lo largo de los diferentes pasos de purificación serán básicamente el análisis de sus actividades de iniciación y DNA polimerasa "in vitro", así como el análisis electroforético complementado por tinción y autorradiografía.

Células de E. coli NF2690 transformadas con el plásmido recombinante, conteniendo el gen 2, pLBw2, fueron crecidas a una temperatura de 30°C en un fermentador conteniendo 20 litros de medio LB así como los

antibióticos ampicilina y kanamicina a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Cuando la densidad óptica a 420 nm fué 0.46, las células fueron inducidas durante 60 minutos por elevación de la temperatura del fermentador a 42°C, a excepción de una alícuota de 2.5 ml que fué centrifugada y resuspendida en el mismo volumen de medio mínimo. Esta alícuota, mantenida a 30°C durante 1 hora, fué inducida durante 60 minutos a 42°C y posteriormente, 0.5 ml de este cultivo fueron incubados durante 5 minutos a 42°C en presencia de 500 μCi de $\{^{35}\text{S}\}$ -metionina (1200 Ci/mmol). Estas células marcadas, recogidas por centrifugación y resuspendidas en 0.2 ml de una solución conteniendo Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, ClNa 50 mM y glicerol 5% (vol/vol), fueron adicionadas a 5 g de las células inducidas en el fermentador, y la mezcla fué lisada mecánicamente con alúmina en las condiciones descritas en Métodos (5.2.2). Este extracto, diluido hasta 30 ml con la solución indicada anteriormente, fué fraccionado con polietilenglicol 8000/dextrano 500 en las condiciones descritas en Métodos (5.1.3). El polietilenglicol se eliminó por precipitación con sulfato amónico hasta el 35% de saturación y la fase acuosa resultante fué precipitada posteriormente con sulfato amónico hasta el 60% de saturación; este precipitado fué disuelto en una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5 y Cl_2Mg 10 mM ajustándose el valor de la conductividad a 6 mSiemens.

La muestra así preparada, fué pasada a través de una columna de afinidad de AD-agarosa de 1.5 x 1.8 cm, preparada y equilibrada como se describe en Métodos (18.1.3), recogién dose las fracciones correspondientes al material no fijado a la columna (lavado), así como a los diferentes pasos de elución descritos igualmente en Métodos (18.1.3).

Las diferentes fracciones obtenidas fueron sometidas a electroforesis en gradientes de acrilamida y a análisis de esta separación electroforética por tinción y fluorografía, en las condiciones descritas en Métodos (17.1.2, 11 y 16). Asimismo, como se describe en Métodos (20.2 y 20.4) se determinaron las actividades de iniciación y DNA polimerasa de las diferentes fracciones obtenidas.

En la tabla 3 se observa que la actividad de iniciación presente en el lisado con alúmina (EXTRACTO), fué recuperada totalmente en la fracción correspondiente al corte con sulfato amónico entre el 35-60% de saturación, previo fraccionamiento con polietilenglicol 8000/dextrano 500 (SULFATO AMONICO 35-60%). Cuando esta fracción fué pasada a través de la columna de AD-agarosa, la mayoría de la actividad de iniciación fué eluída de la columna con ClNa 0.7 M (Tabla 3). No se detectó actividad de iniciación en las fracciones correspondientes al LAVADO (no mostrado), ni a las eluídas con ClNa 0.35 M

TABLA 3. Purificación de la proteína p2

Fracción	Proteína total mg	<u>ACTIVIDAD DE INICIACION</u>		<u>ACTIVIDAD DNA POLIMERASA</u>	
		U. totales pmol	Act. específica pmol/mg	U. totales nmol	Act. específica nmol/mg
Extracto	354	117	0.33	1035	2.9
S.amónico(35-60%)	35	123	3.5	569	16.2
AD-agarosa(0.35 M)	10.6	0	0	193	18.2
AD-agarosa(0.7 M)	1.5	35	23	54	36
Fosfocelulosa(0.4 M)	0.05	13.3	226	20	400

Células de *E. coli* NF2690 (5 gr), conteniendo el plásmido recombinante pLBw2, se lisaron con alúmina y se extrajeron con una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, ClNa 50 mM y glicerol 5% (v/v), como se describe en Métodos (5.2.2). Después de centrifugar a 20.000 x g durante 15 minutos, este extracto fué tratado con PEG 8.000/dextrano 500 en presencia de ClNa 4 M, como se describe en Métodos (5.1.3). El polietilenglicol se eliminó por precipitación con sulfato amónico al 35% de saturación y la fase acuosa resultante fué posteriormente precipitada con sulfato amónico hasta el 60% de saturación. El precipitado, disuelto en el tampón A (Tris. ClH 50 mM, pH 7.5 y Cl₂Mg 10 mM), se pasó a través de una columna de AD-agarosa (15 cm x 1.8 cm) saturada con 1.5 volúmenes de lisozima (150 µg/ml) y equilibrada con tampón A. Después de lavar exhaustivamente con la solución anterior, la columna se eluyó con el tampón B (Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, Cl₂Mg 1 mM y ATP 1 mM) y posteriormente con el mismo tampón B, pero conteniendo ClNa a concentraciones crecientes (0.35 M, 0.7 M y 1 M). Una alícuota correspondiente al 20% del total de la fracción AD-agarosa (0.7 M), conteniendo proteína p2, se pasó a través de una columna de fosfocelulosa (1.8 cm x 1.2 cm), preparada y equilibrada en Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, ClNa 50 mM y glicerol 5% (v/v), como se describe en Métodos (18.1.2.2). La columna fué lavada con la solución anterior y posteriormente eluida con una solución que contenía Tris-ClH 50 mM, pH 7.0, DTT 1 mM, glicerol 5% (v/v) y ClNa a una concentración de 0.4 M y 0.6 M, respectivamente.

La cantidad de complejo p3-dAMP correspondiente al ensayo de actividad de iniciación de las diferentes fracciones fué cuantificado cortando del gel la banda marcada con ³²P y determinando la radiación Cerenkov, como se describe en Métodos (15.3). Se definió la unidad de actividad de iniciación como la cantidad de enzima que

cataliza la formación de 1 picomol de complejo p3-dAMP en 20 minutos y a una temperatura de 30°C, en las condiciones del ensayo de iniciación "in vitro" descrito en Métodos (20.2). Se definió la unidad de actividad DNA polimerasa como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 nmol de dTMP en material insoluble en ácido, en 10 minutos a una temperatura de 30°C, utilizando como molde poli (dA)-(dT)₁₂₋₁₈, en las condiciones del ensayo de DNA polimerasa descritas en Métodos (20.4).

La concentración de proteína se determinó por el método de BRADFORD (35). La cantidad de proteína en la fracción fosfocelulosa (0.4 M) fue determinada por densitometría de las bandas teñidas en el gel, utilizando diferentes cantidades de SAB como patrón.

Los valores correspondientes a la fracción fosfocelulosa (0.4 M) reflejados en esta tabla, están extrapolados al caso en que se hubiese sometido a esta cromatografía el 100% de la fracción AD-agarosa (0.7 M).

(Tabla 3) o con ClNa 1 M (no mostrada) de la columna de AD-agarosa.

Por otra parte, y como se muestra en la Tabla 3, la actividad DNA polimerasa presente en el corte con sulfato amónico entre el 35-60% de saturación fué fraccionada en la columna de AD-agarosa en 2 picos de actividad : uno de ellos fue eluido con ClNa 0.35 M y el otro con ClNa 0.7 M, copurificando con la actividad de iniciación. No se detectó actividad DNA polimerasa en el resto de las fracciones obtenidas con esta columna (resultados no mostrados).

Cuando se analizaron los dos picos de actividad DNA polimerasa se observó que eran claramente diferentes: el pico eluido con ClNa 0.35 M, al igual que la DNA polimerasa I de E. coli, tuvo una actividad DNA polimerasa sobre DNA activado aproximadamente igual al 50% de la obtenida cuando se utilizó poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈ como molde, mientras que la fracción eluida con ClNa 0.7 M tuvo una actividad DNA polimerasa sobre DNA activado que correspondió solamente al 15% de la obtenida con poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈.

Los resultados obtenidos con la fracción eluida con ClNa 0.7 M de la columna de AD-agarosa concuerdan con experimentos anteriores en los que se observó que la DNA polimerasa asociada a la proteína p2 era especialmente activa utilizando el molde "primer" sintético

poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈.

Otro criterio que diferenció las dos actividades DNA polimerasa fraccionadas fué obtenido analizando el valor de la Km para el TTP que fué 2.5×10^{-6} M en el caso de la actividad eluída con ClNa 0.35 M, mientras que en el caso de la actividad eluída con ClNa 0.7 M fué 1×10^{-6} M.

Por otra parte, cuando se analizaron las diferentes fracciones eluídas de la columna de AD-agarosa por tinción y fluorografía de los análisis electroforéticos, como se describe en Métodos (11,16 y 17.1.2), se observó, únicamente en el caso de la fracción eluída con ClNa 0.7 M, la presencia de una banda de proteína (Figura 17, canal a), correspondiente a la movilidad electroforética esperada (68.000 daltons) para la proteína p2, fuertemente marcada como consecuencia tanto de las condiciones de inducción y estabilidad, como del grado de enriquecimiento obtenido con esta cromatografía (Figura 18, canal a).

El porcentaje de recuperación en la fracción AD-agarosa (0.7 M), de la proteína p2 presente en el extracto, fué de un 30% según determinaciones realizadas a partir de los datos de la actividad de iniciación. No es posible determinar, en este caso, la recuperación de proteína p2 a partir de los datos de actividad DNA polimerasa, debido a la presencia en el extracto de otras

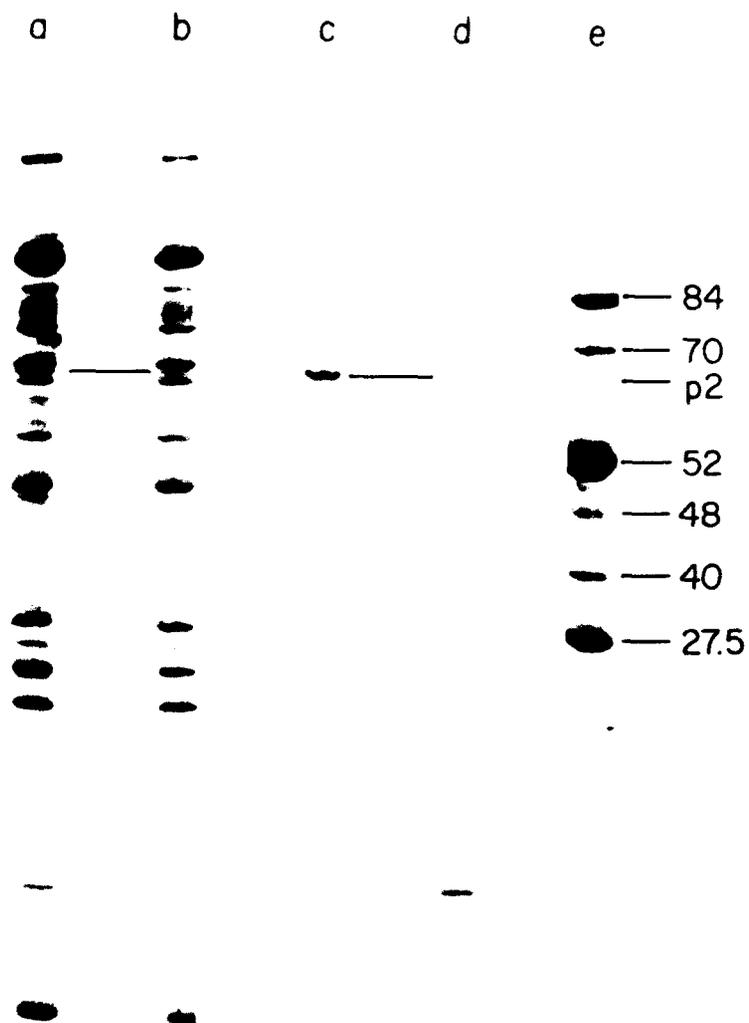


Figura 17. Análisis electroforético de la proteína p2 purificada. Las fracciones de proteína correspondientes a los distintos pasos de purificación se sometieron a electroforesis en placas de gel conteniendo un gradiente entre el 10-20% de acrilamida en presencia de SDS. Los geles fueron posteriormente teñidos como se describe en Métodos (11). Canales : a. fracción eluida con ClNa 0.7 M de la columna de AD-agarosa (70 µg); b-d. fracciones correspondientes a la cromatografía en fosfocelulosa;

b. lavado (50 μg); c. fracción eluida con ClNa 0.4 M (2 μg); d. fracción eluida con ClNa 0.6 M (2 μg); e. proteínas estructurales del fago $\emptyset 29$ (8 μg). A la derecha se indican los pesos moleculares (expresados en Kilodaltons) de las proteínas correspondientes al canal "e", así como la posición esperada para la proteína p2.

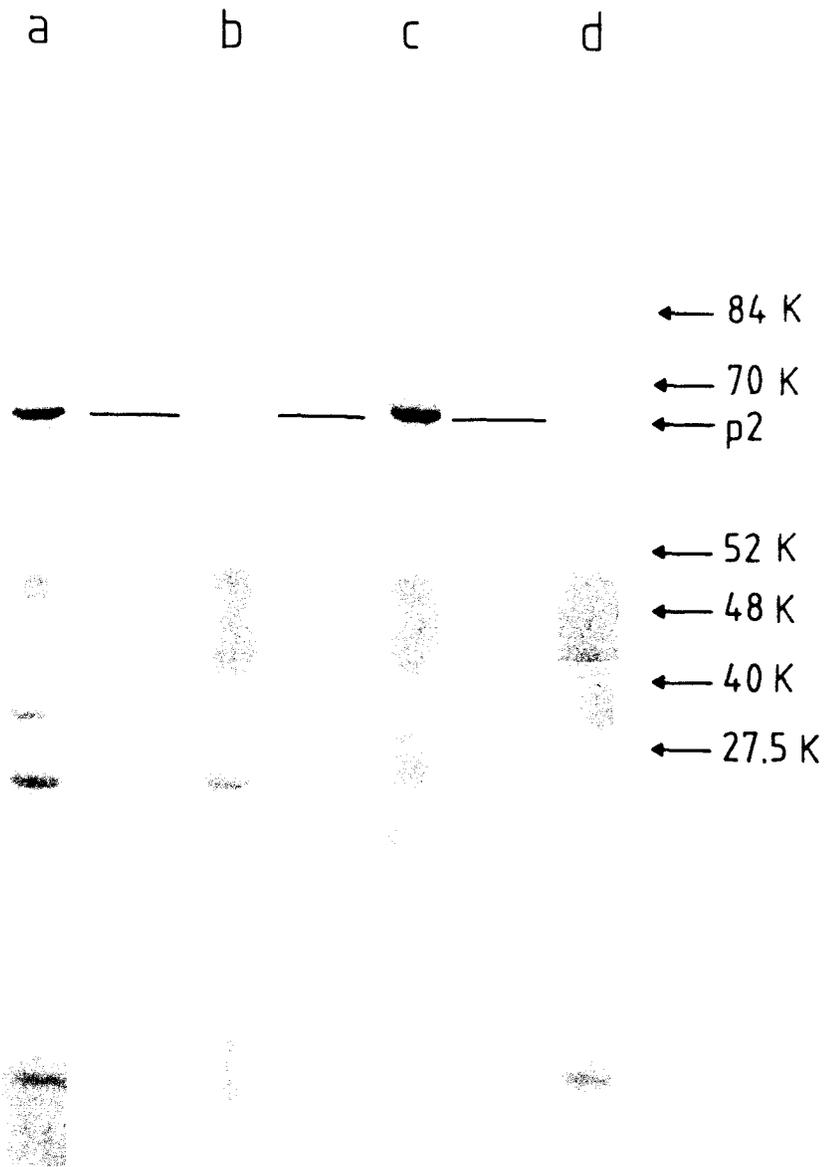


Figura 18. Fluorografía del análisis electroforético mostrado en la figura anterior. El gel correspondiente al análisis electroforético mostrado en la figura 18, después de ser teñido y fotografiado, se sometió a fluorografía, como se describe en Métodos (16).
Canales : a. fracción AD-agarosa (0.7 M); b-d. fracciones correspondientes a la cromatografía en fosfocelulosa; b. lavado; c. 0.4 M; d. 0.6 M. A la derecha se indican los pesos moleculares (expresados en Kilodaltons) de las proteínas estructurales de Ø29, así como la posición esperada para la proteína p2.

actividades DNA polimerasas (celulares) además de la correspondiente a la proteína p2.

Por otra parte, los péptidos de 5.800 y 3.400 daltons, inducidos también por el plásmido recombinante pLBw2, y presentes en el extracto de células utilizado en la purificación, fueron detectados por fluorografía del análisis electroforético correspondiente a la fracción eluída con ClNa 0.35 M de la columna de AD-agarosa (resultados no mostrados). El péptido < 2.000 daltons descrito en Resultados (2.2), no fué detectado debido probablemente a su baja estabilidad en las condiciones de inducción utilizadas.

Con objeto de purificar la proteína p2 a homogeneidad, un 20% del total de la fracción eluída con ClNa 0.7 M de la columna de AD-agarosa se diluyó con glicerol hasta que el valor de la conductividad fué 4 mSiemens, y fué pasado a través de una columna de fosfocelulosa (1.8 cm x 1.2 cm), preparada y equilibrada en las condiciones descritas en Métodos (18.1.2.2), recogién dose las fracciones correspondientes al material no fijado (LAVADO) así como las correspondientes a los diferentes pasos de elución, descritos igualmente en Métodos (18.1.2.2). Las diferentes fracciones obtenidas fueron sometidas a electroforesis en gradiente de acrilamida, analizándose esta separación electroforética por tinción y fluorografía, en las condiciones descritas en Métodos

(17.1.2, 11 y 16). Asimismo, tal como se describe en Métodos (20.2 y 20.4), se determinaron las actividades de iniciación y DNA polimerasa de las diferentes fracciones obtenidas.

El análisis electroforético, complementado por tinción y fluorografía, de estas fracciones mostró la presencia de una banda mayoritaria de proteína (Figura 17, canal c), fuertemente marcada con ^{35}S (Figura 18, canal c), en la fracción eluída con ClNa 0.4 M de la columna de fosfocelulosa. Análisis densitométricos del gel, realizados como se describe en Métodos (13) mostraron que el grado de pureza relativa de la proteína p2, presente en la fracción eluída de la columna de fosfocelulosa con ClNa 0.4 M era de, aproximadamente, un 86%.

No fueron detectadas, ni por tinción, ni por fluorografía, bandas de proteína en la posición de p2 en las fracciones correspondientes al LAVADO (Figuras 17 y 18, canal b), o al material eluído con ClNa 0.6 M (Figuras 17 y 18, canal d) de la columna de fosfocelulosa.

Como se muestra en la Tabla 3, la proteína p2, en este último paso de purificación tenía actividades de iniciación y DNA polimerasa.

El porcentaje de recuperación en la fracción fosfocelulosa (0.4 M), de la proteína p2 presente en la fracción AD-agarosa (0.7 M) fué de un 38% y un 37%, según determinaciones realizadas a partir de los datos de las actividades de iniciación y DNA polimerasa respectivamente. La similitud entre los dos valores de recuperación obtenidos, indica nuevamente la asociación de ambas actividades.

En resumen, el porcentaje de recuperación en el último paso de purificación, de la proteína p2 presente en el extracto de partida fué de un 11%, obteniéndose un factor de purificación de 800 veces, según determinaciones realizadas a partir de los datos de actividad total y actividad específica, respectivamente, obtenidos en la reacción de iniciación "in vitro".

En algunos casos, y como se verá más adelante en Resultados (5.3.2), esta fracción fosfocelulosa (0.4 M), fué sometida a un paso adicional de purificación consistente en centrifugación en gradiente de glicerol. En estos casos se observó que la actividad DNA polimerasa estaba presente en las fracciones correspondientes al tamaño molecular de la proteína p2, lo que está de acuerdo con resultados anteriores que demostraron que la actividad DNA polimerasa estaba asociada a una proteína de 68.000 daltons (ver Resultados (3.2)).

3.4. Requerimientos de la DNA polimerasa de Ø29.

Los requerimientos para la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 fueron estudiados utilizando la fracción fosfocelulosa (0.4 M)

Como todas las DNA polimerasas, la proteína p2 presentó un absoluto requerimiento por la presencia de un DNA molde así como por cationes Mg^{+2} , cuyo papel es formar un quelato con los precursores nucleotídicos de forma que puedan ser reconocidos por el enzima (2).

La actividad con el molde "primer" poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈ fué aproximadamente 7 veces superior a la obtenida con DNA activado.

Cuando se eliminó el ATP de la mezcla de reacción de DNA polimerasa, descrita en Métodos (20.4), la actividad disminuyó hasta un 40%. Cuando se ensayó la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 en presencia de altas concentraciones de sal, se observó un fuerte efecto inhibitorio : la adición de ClK 0.15 M y 0.25 M disminuyó la actividad control a un 28% y 4%, respectivamente. Por otra parte, y como se describió anteriormente, la proteína p2 se inactiva rápidamente cuando se almacena a baja fuerza iónica.

La droga 6-(p-hidroxifenilazo)uracilo (HPUra) o antisuero contra la DNA polimerasa III de B. subtilis, ambas sustancias inhibitoras de la actividad de este enzima, no tuvieron efecto sobre la actividad DNA polimerasa de la proteína p2.

El valor de la K_m para el TTP que presentó la proteína p2 purificada, ensayada con DNA activado, fué $0.7 \times 10^{-6} M$, coincidiendo con el valor obtenido con la fracción AD-agarosa ($0.7 M$), como se describió anteriormente en Resultados (3.3).

Cuando se analizó la cinética de la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 purificada, utilizando el molde "primer" poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈, ésta fué de tipo sigmoidal, no produciéndose incorporación de TMP hasta que se utilizó una concentración de TTP superior a $2 \mu M$. Estos resultados parecen estar relacionados con el hecho de que, utilizando extractos de B. subtilis infectada con $\phi 29$ en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}P\}$ -dATP a una concentración de $0.5 \mu M$, el material que se produce en la reacción de iniciación "in vitro" sea p3-dAMP y no el producto esperado p3-AAA, el cual solo se forma cuando la concentración de dATP es aumentada (67).

4. Replicación "in vitro" del DNA de $\phi 29$ (Sistema purificado)

Se ha postulado y demostrado mediante la utilización de un sistema "in vitro" que el primer paso en la replicación del DNA de $\phi 29$ es la formación de un complejo covalente entre una molécula libre de proteína terminal y 5'-dAMP en presencia del molde de DNA de $\phi 29$ conteniendo la proteína terminal. Este complejo sirve como "primer" para la elongación de la cadena a partir

de ambos extremos de la molécula de DNA (67). La caracterización y purificación de los productos génicos que intervienen en el paso de iniciación nos ha permitido el desarrollo de un sistema de replicación "in vitro", que refleja fielmente la replicación del DNA de Ø29.

Los resultados que se presentan a continuación demuestran que la reacción de iniciación "in vitro", es decir, la formación del complejo p3-dAMP requiere la presencia, como únicas proteínas virales, de la DNA polimerasa (p2) y de la proteína terminal (p3), si bien esta reacción es fuertemente estimulada por algún factor(es) protéico celular. Asimismo, la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 es capaz de elongar específicamente el complejo p3-dAMP formado en la reacción de iniciación, dando lugar a moléculas completas de DNA de nueva síntesis. Estos resultados indican que la proteína p2 podría ser la única DNA polimerasa implicada en la replicación del DNA de Ø29.

También se describen los requerimientos de este sistema de replicación "in vitro" que utiliza, como únicas proteínas, la DNA polimerasa de Ø29 (p2) y la proteína terminal (p3).

4.1. Iniciación de la replicación

4.1.1. Formación "in vitro" del complejo p3-dAMP con proteína p2 purificada. Requerimiento de un factor(es) celular

Como se observa en la Figura 19, canal c, la proteína p2 purificada, correspondiente a la fracción fosfocelulosa (0.4 M), fué inactiva por sí sola en la reacción de iniciación "in vitro" realizada como se describe en Métodos (20.3), confirmando resultados anteriores que indicaban el requerimiento de proteína p3 libre en esta reacción. La actividad se restauró cuando la fracción purificada de proteína p2 fué complementada con extractos de E. coli transformada con el plásmido conteniendo el gen 3 de Ø29, pKC30 A1 (canal a), o con extractos de B. subtilis infectada con un mutante sus2 de Ø29 (canal b). Sin embargo, cuando se sustituyeron estos extractos por proteína p3 purificada, la reacción de iniciación fué muy ineficiente, detectándose la formación de muy poca cantidad de complejo p3-dAMP (canal d). Esta pérdida de actividad respecto a la mostrada en los canales "a" y "b" indicaba la implicación de algún factor(es), ya fuese viral o celular, en esta reacción. Cuando las proteínas p2 y p3 purificadas fueron complementadas con extractos de B. subtilis no infectada (canal e) o infectada con un doble mutante sus2sus3 de Ø29 (canal f) (preparado

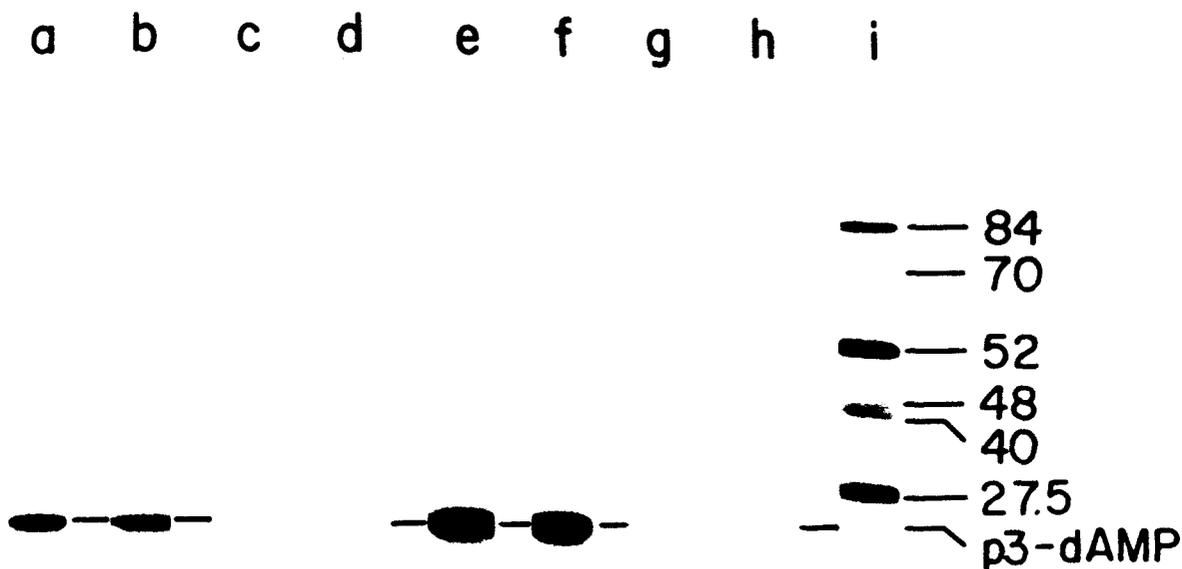


Figura 19. Actividad de la proteína p2 purificada, en la formación del complejo de iniciación p3-dAMP. Se incubó proteína p2 purificada (10 ng) con extractos de E. coli transformada con el plásmido recombinante conteniendo el gen 3 de Ø29, pKC30 A1 (canal a), con extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus2(513) de Ø29 (canal b) ó sin extracto (canal c), ensayándose la formación del complejo p3-dAMP en presencia de p3-DNA de Ø29 como molde. Canales (d-h). se incubaron las proteínas p2 (10 ng) y p3 (64 ng) con complejo p3-DNA de Ø29 (excepto cuando se indique) como molde, con las siguientes adiciones: d, ninguna; e, extractos de B. subtilis no infectada (3 µg), preparado como se describe en Métodos (5.3); f, extracto de B. subtilis infectada con el mutante sus2 (513) sus3(91) de Ø29 (3 µg) preparado como se describe

en Métodos (5.3); g, como "e" pero sin complejo p3-DNA de Ø29 como molde; h, SAB (3 µg). En el canal "i" se muestran las proteínas estructurales de Ø29 marcadas con ³⁵S. A la derecha se indican los pesos moleculares (expresados en Kilodaltons), de las proteínas correspondientes al canal "i", así como la movilidad electroforética del complejo p3-dAMP.

como se describe en Métodos (5.3.)), la actividad de iniciación fué estimulada fuertemente (aproximadamente 20 veces) en ambos casos, lo cual indicaba la implicación de algún factor(es) celular, pero no de otras proteínas virales, en la formación del complejo p3-dAMP. Como se observa en el canal "g", la formación del complejo de iniciación en presencia de proteínas p2 y p3 purificadas y extractos de B. subtilis no infectada, fué totalmente negativa en el caso de no adicionar el molde p3-DNA de Ø29 a la mezcla de incubación. Como control de especificidad, el canal "h" muestra que la adición de una cantidad equivalente de SAB no pudo reemplazar a los extractos de B. subtilis como dadores del factor(es) celular.

La baja actividad en la reacción de iniciación "in vitro" utilizando únicamente las proteínas p2 y p3 parecía indicar que la presencia del factor(es) celular era un requisito casi indispensable para la formación del complejo p3-dAMP, pero resultados que se presentarán más adelante muestran que la reacción fué fuertemente estimulada cuando las proteínas p2 y p3 purificadas se ensayaron en presencia de iones NH_4^+ , lo cual indica que ambas proteínas son suficientes para catalizar esta reacción. Por tanto, el papel del factor(es) celular no parece incidir directamente en la formación del enlace entre la proteína p3 y 5'-dAMP sino que, probablemente,

interviene mejorando las condiciones necesarias para que éste se produzca (ver Discusión).

Como se observa en la Figura 20, fué posible utilizar, como fuente de factor(es) celular, extractos de B. subtilis (canal a) o de E. coli (canal b), para estimular la formación del complejo de iniciación respecto a la obtenida con proteínas p2 y p3 purificadas (canal c). Estos resultados explican el alto nivel de actividad obtenido cuando se utilizaba proteína p2 purificada complementada con extractos de E. coli conteniendo p3 (Figura 20, canal a) o cuando se utilizó proteína p3 purificada complementada con extractos de E. coli conteniendo p2 (Figura 13, canal h).

4.1.2. Naturaleza protéica del factor(es) celular

Como se observa en la Figura 21, cuando el extracto de B. subtilis no infectada (dador del factor(es) celular) se preincubó durante 1 hora a 37°C y posteriormente se hirvió a 100°C durante 10 minutos, se observó una pérdida de actividad estimuladora (canal b), cuando se ensayó "in vitro" en presencia de proteínas p3 y p2 en las condiciones descritas en Métodos (20.3), respecto a la actividad obtenida con la misma fracción sin preincubar (canal a). Ahora bien, cuando la preincubación se realizó en presencia de proteinasa K (200 µg/ml), la actividad se perdió completamente (canal c), como se

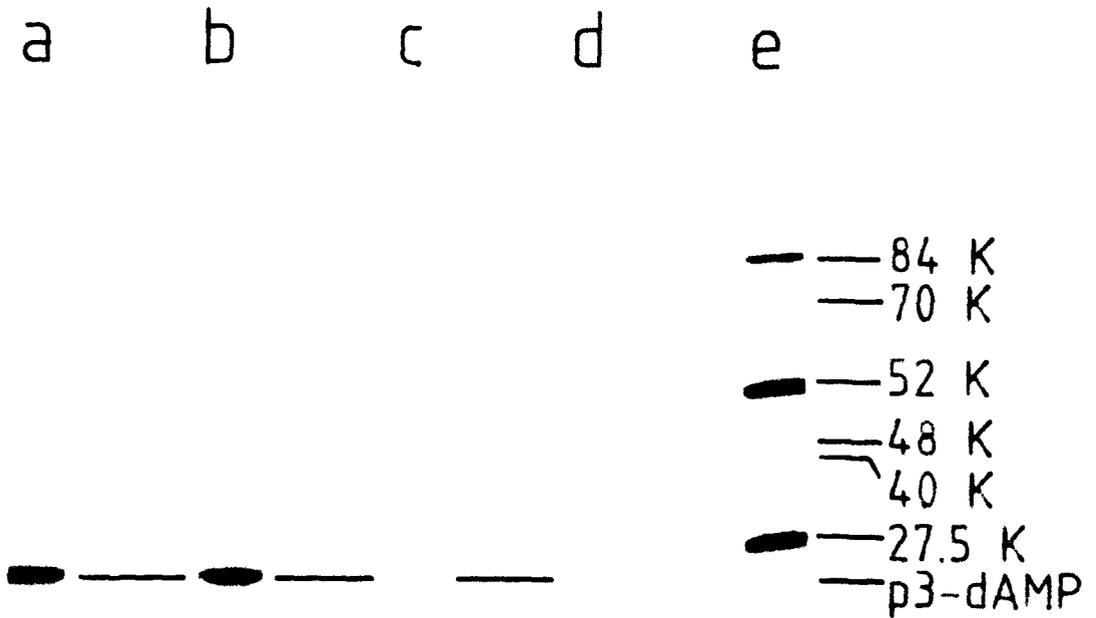


Figura 20. E. coli versus B. subtilis como dadores del factor(es) celular. Se incubaron las proteínas p2 (10 ng) y p3 (64 ng) con complejo p3-DNA de $\phi 29$ (excepto cuando se indique) ensayándose la formación del complejo p3-dAMP en las condiciones descritas en Métodos (20.3), con las siguientes adiciones : a, extracto de B.subtilis no infectada (3 μ g), preparado como se indica en Métodos (5.3); b, extracto de E. coli (3 μ g), preparado como se indica en Métodos (5.3); c, ninguna; d, como en "b" pero sin complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde. En el canal "e" se muestran las proteínas estructurales de $\phi 29$ marcadas con 35 S. A la derecha se indican los pesos moleculares (expresados en Kilodaltons), de las proteínas correspondientes al canal "e", así como la movilidad electroforética del complejo p3-dAMP.

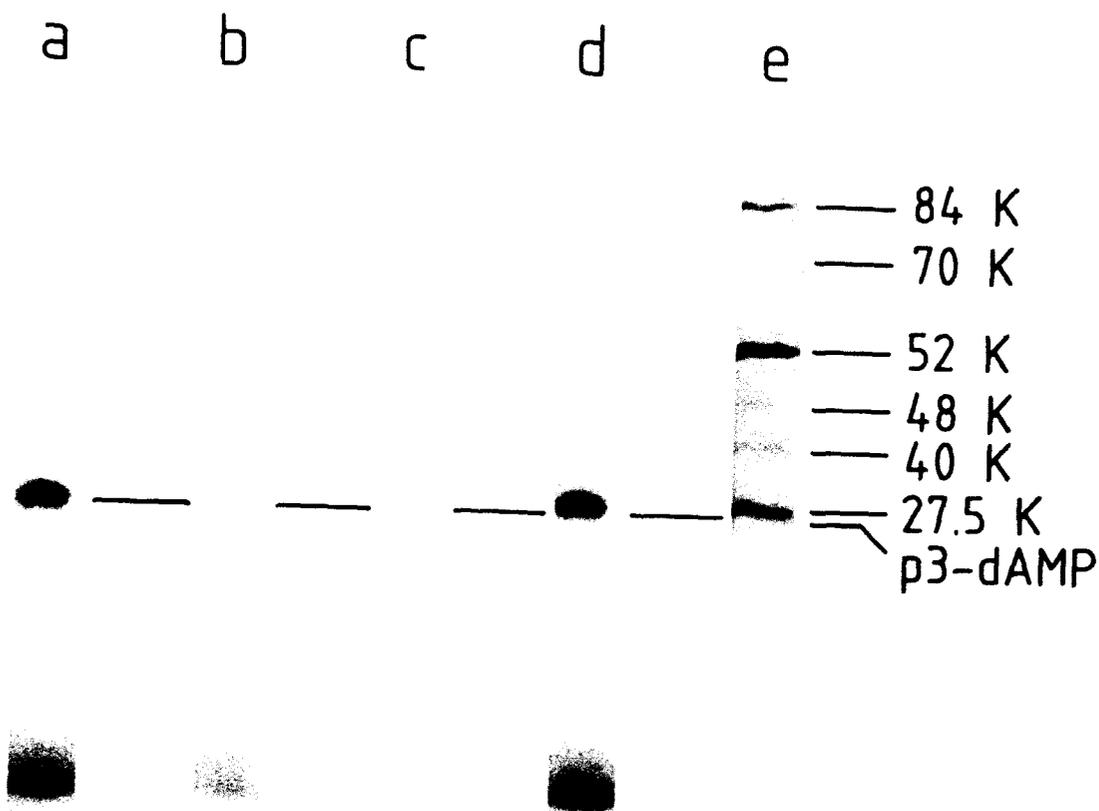


Figura 21. Naturaleza proteica del factor(es) celular. Se utilizaron extractos de B. subtilis no infectada, preparados como se describe en Métodos (5.3), como dadores del factor(es) celular estimulador de la reacción de iniciación "in vitro". En algunos casos esta fracción, en ausencia o presencia de proteinasa K (200 µg/ml), fue preincubada durante 1 hora a 37°C y a continuación durante 10 minutos a 100°C. Se incubaron las proteínas p2 (10 ng) y p3 (64 ng) con complejo p3-DNA de Ø29, ensayándose la formación del complejo de iniciación p3-dAMP en las condiciones descritas en Métodos (20.3), con las siguientes adiciones : a, extractos de B. subtilis (3 µg); b, extracto de B. subtilis (3 µg) preincubado en ausencia de proteinasa K; c, extracto de B. subtilis (3 µg) preincubado en presencia de proteinasa K; d, como el canal "b" pero adicionando una fracción "control" preincubada en presencia de proteinasa K. En el canal "e"

se muestran las proteínas estructurales de Ø29 marcadas con ³⁵S. A la derecha se indican los pesos moleculares (expresado en Kilodaltons) de las proteínas correspondientes al canal "e", así como la movilidad electroforética del complejo p3-dAMP.

dedujo por comparación con la reacción obtenida en presencia de, únicamente, proteínas p2 y p3 purificadas. Como control de que la proteinasa K actuó únicamente durante la preincubación del extracto de B. subtilis no infectada, siendo inactivada posteriormente con el tratamiento a 100°C durante 10 minutos, una fracción "control" preincubada con proteinasa K e inactivada en las mismas condiciones, fué adicionada a la mezcla de reacción correspondiente al canal "a", previamente al ensayo de iniciación "in vitro". Como se observa en el canal "d", la actividad obtenida fué equivalente a la mostrada en el canal "a".

Estos resultados parecen indicar que el factor (es) celular, estimulador de la formación "in vitro" del complejo p3-dAMP, tiene naturaleza protéica.

4.2. Elongación "in vitro" del DNA de Ø29

4.2.1. Complejo p3-DNA de Ø29 como molde para la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 : requerimiento de la proteína terminal p3

Debido a la naturaleza de la proteína p2 como una DNA polimerasa cabía pensar que, además de su papel en la iniciación, tuviese un papel en la elongación del DNA de Ø29. Por tanto, el primer ensayo que realizamos en este sentido, consistió en determinar si la actividad DNA polimerasa de la proteína p2,

muy activa con el molde "primer" sintético poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈, podría utilizar como molde el complejo p3-DNA de Ø29.

La Figura 22 muestra que cuando se incubó la proteína p2, en las condiciones del ensayo de DNA polimerasa descritas en Métodos (20.4), con complejo p3-DNA de Ø29, con DNA de Ø29 desproteínizado o en ausencia de DNA, no hubo incorporación de nucleótidos en ninguno de los casos. El mismo resultado se obtuvo con la proteína p3 purificada, en este ensayo de DNA polimerasa. Sin embargo, cuando se utilizaron ambas proteínas a la vez se observó incorporación de nucleótidos, pero únicamente en el caso de utilizar complejo p3-DNA de Ø29 como molde. Estos resultados sugerían fuertemente que para que hubiese elongación era necesario que ocurriese previamente la formación del complejo p3-dAMP, reacción que, como vimos anteriormente, ocurre (aunque ineficientemente) en presencia de las proteínas p2 y p3 virales, y es absolutamente dependiente de la proteína p3 covalentemente unida al DNA de Ø29. Esta incorporación de nucleótidos, teniendo en cuenta el requerimiento de proteína p3 y la especificidad de molde, no es debida a una reacción de tipo reparación sino que parece reflejar la replicación del DNA de Ø29. Por tanto, estos resultados sugerían por primera vez un papel de la proteína p2 en la elongación del DNA de Ø29.

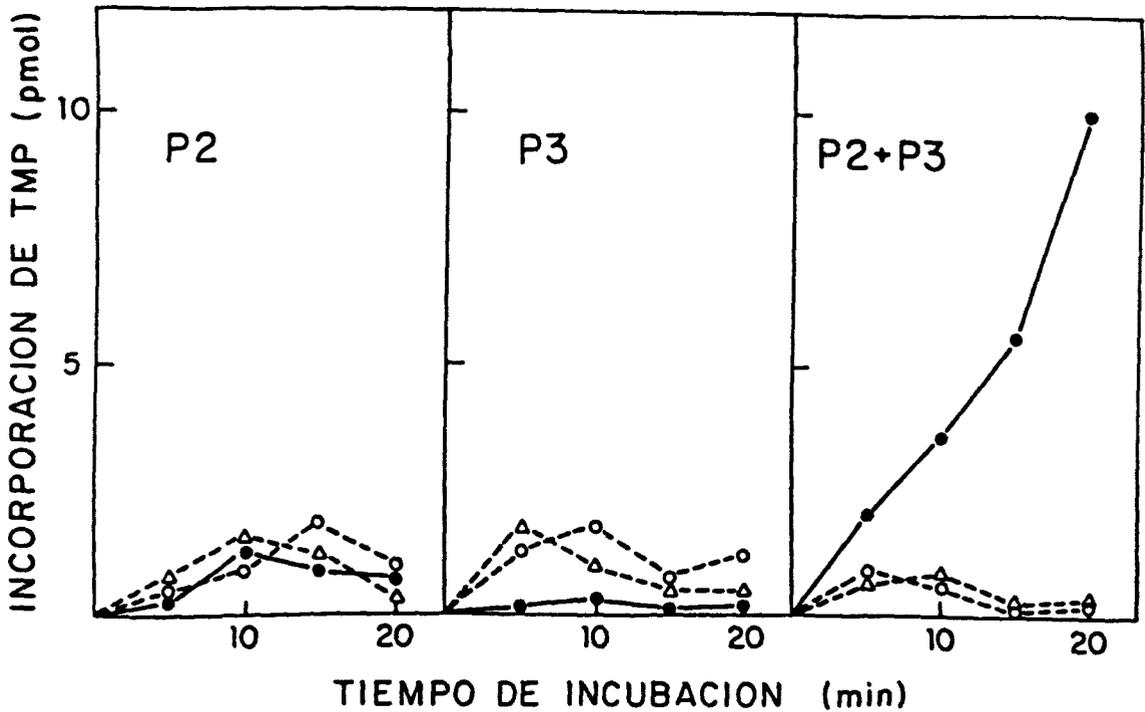


Figura 22. Actividad DNA polimerasa de la proteína p2 utilizando complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde. Se incubó proteína p2 (10 ng) con complejo p3-DNA de $\phi 29$ (●—●), con DNA de $\phi 29$ desproteinizado (o---o) ó sin DNA (Δ--Δ), en presencia o ausencia de proteína p3 purificada (64 ng) y en las condiciones del ensayo de DNA polimerasa descritas en Métodos (20.4). Un control de proteína p3 fué incubado, en ausencia de proteína p2, con los mismos moldes de DNA. Después de 15 minutos a 30°C se determinó la incorporación de (^3H)-TMP en material insoluble en ácido tricloroacético.

4.2.2. Elongación del complejo de iniciación p3-dAMP por la DNA polimerasa de Ø29

4.2.2.1. Especificidad del producto elongado en presencia de un terminador de cadena

Para demostrar que la incorporación de nucleótidos dependiente de la presencia de las proteínas p2 y p3 y del molde p3-DNA de Ø29, mostrada en la Figura 22, ocurría por elongación del complejo p3-dAMP, y que el producto elongado era específico, es decir, correspondía a material elongado fielmente desde ambos extremos del DNA, se realizó un experimento de "pulso y caza" similar al descrito por Peñalva y Salas (67), con el que demostraron que el complejo p3-dAMP formado "in vitro" sirve de "primer" para la elongación del DNA de Ø29.

Las proteínas p2 y p3 purificadas se incubaron con complejo p3-DNA de Ø29 durante 5 minutos a 30°C en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 0.25 μM , para que ocurriese la formación del complejo de iniciación. Posteriormente, y debido a que la secuencia nucleotídica a partir de los extremos 5' del DNA de Ø29 es A-A-A-G-T-A-A-G-C-.. (extremo izquierdo) y A-A-A-G-T-A-G-G-G-T-A-C-.. (extremo derecho) (55,56), se adicionó un exceso de dATP, TTP, dGTP y dideoxi-CTP para permitir que la elongación ocurriese solamente hasta los nucleótidos 9º y 12º a partir de los extremos izquierdo y derecho respectivamente.

La Figura 23, canal b, muestra que después de la "caza" se detectaron, además de la banda de complejo p3-dAMP, dos nuevas bandas marcadas, en las posiciones esperadas para un material elongado correspondiente a proteína p3 unida covalentemente a oligonucleótidos de 9 y 12 bases.

4.2.2.2. Elongación del complejo de iniciación p3-dAMP por la DNA polimerasa de ϕ 29

Hemos visto anteriormente que la DNA polimerasa inducida por ϕ 29 (proteína p2) además de catalizar la formación del complejo de iniciación p3-dAMP, es capaz de elongarlo, copiando la cadena de DNA hasta, al menos, 9 y 12 nucleótidos a partir de los extremos izquierdo y derecho, respectivamente. Para determinar si la proteína p2 purificada era capaz de continuar la elongación hasta un mayor tamaño se realizó un ensayo de replicación en presencia de los 4 dNTPs, utilizando proteínas p2 y p3 purificadas y complejo p3-DNA de ϕ 29 como molde, en las condiciones descritas en Métodos (20.6). Después de incubar durante 20 minutos a 30°C, el DNA marcado sintetizado "de novo" se sometió a análisis de restricción con el enzima Hind III, como se describe en Métodos (21). La Figura 24A, canal a, muestra la autorradiografía del análisis electroforético del DNA marcado en estas condiciones, en la que se puede observar que todos los fragmentos Hind III del

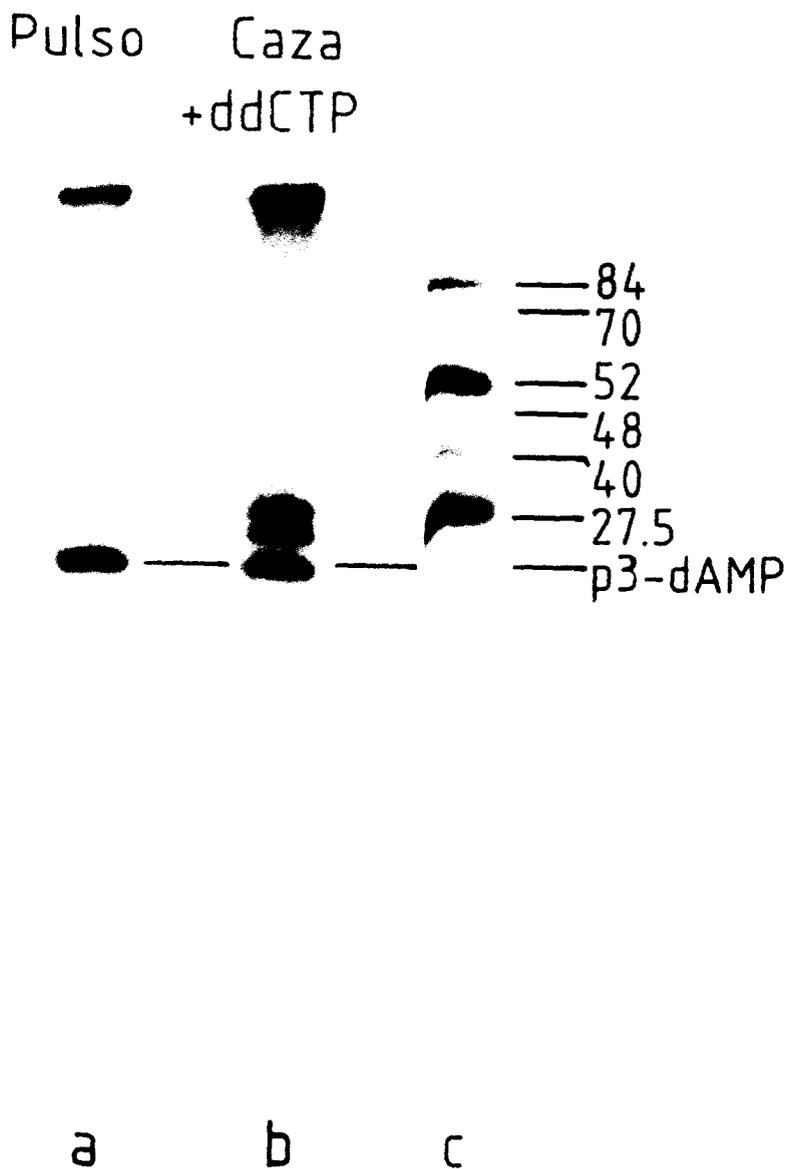


Figura 23. Elongación del complejo de iniciación p3-dAMP por la proteína p2, en presencia de dideoxi-CTP. Las proteínas p2 y p3 purificadas se incubaron con complejo p3-DNA de Ø29 en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 0.25 μM (5 μCi), para permitir la formación del complejo de iniciación p3-dAMP. Después de 5 minutos a 30°C (canal a), se añadieron dATP/dGTP/TTP hasta una concentración final de 40 μM (cada uno) y dideoxi-CTP hasta 100 μM , continuándose la incubación durante 15 minutos a 30°C (canal b). Las muestras se pasaron a través de

columnas de Sephadex G-50 para eliminar el $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP no incorporado y se precipitaron con ácido tricloroacético, analizándose posteriormente por electroforesis en placas de gel conteniendo acrilamida 20% en presencia de SDS, como se describe en Métodos (7.1.2). El canal "c" muestra las proteínas estructurales de Ø29 marcadas con ^{35}S , utilizadas como marcadores electroforéticos. A la derecha se indican los pesos moleculares (expresado en Kilodaltons) de las proteínas correspondientes al canal "c", así como la movilidad electroforética esperada para el complejo p3-dAMP.

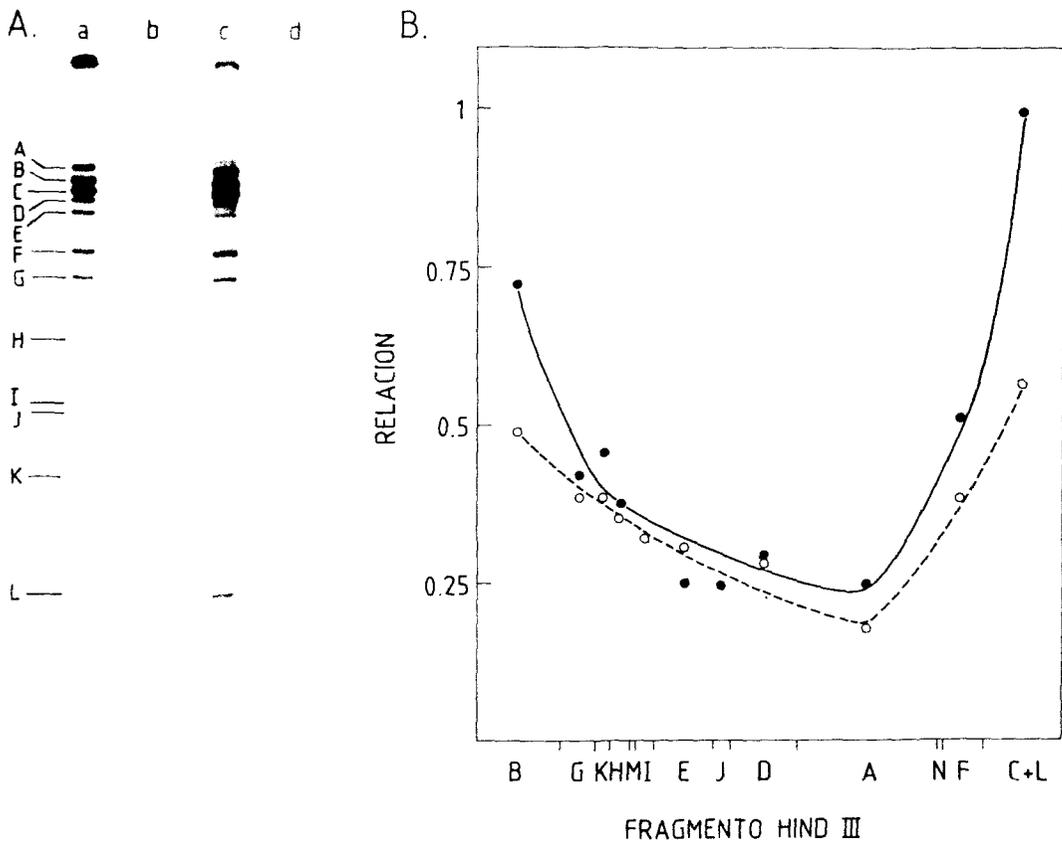


Figura 24. Replicación del complejo p3-DNA de $\phi 29$ con DNA polimerasa de $\phi 29$ (p2) y proteína terminal (p3). Efecto del factor(es) celular. Parte A. El DNA marcado con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP $10 \mu\text{M}$ ($5 \mu\text{Ci}$) después de 20 minutos a 30°C en el ensayo de replicación descrito en Métodos (20.6), en presencia de complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde y proteínas p2 (10 ng) y p3 (64 ng) purificadas se trató con proteinasa K y Hind III y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida, como se describe en Métodos (21). Después de la electroforesis el gel se secó y se sometió a autorradiografía. Canales : a, sistema completo (1.16 pmoles de dNMP incorporados);

b, -p3 (0.28 pmoles de dNMP incorporados); c, + factor (es) celular (3 μ g) (2.04 pmoles de dNMP incorporados); d, -p3 + factor(es) celular (3 μ g) (0.2 pmoles de dNMP incorporados). A la izquierda se indica la movilidad electroforética de los fragmentos Hind III del DNA de ϕ 29. Parte B. Cada banda del gel mostrado en la parte A fué cortada, determinándose la radioactividad Cerenkov. Se representó la relación entre la radioactividad en cada fragmento y el tamaño del mismo (normalizando a 1 el valor obtenido para el fragmento terminal L + C correspondiente al canal "c" de la parte A), respecto a la localización de cada fragmento en el mapa físico del DNA de ϕ 29. La incorporación en el fragmento L + C fué 0.16 y 0.28 pmoles de dNMP en el caso de utilizar las proteínas p2 y p3 en ausencia (o---o) ó en presencia (●—●) de la fracción dadora del factor(es) celular, respectivamente.

DNA de $\phi 29$ (excepto el M y el N, no detectables debido a su pequeño tamaño) están marcados con ^{32}P . Cuando se presentó la relación entre la radioactividad en el fragmento y el tamaño del mismo, respecto a su localización en el mapa físico del DNA de $\phi 29$ (Figura 24B), se observó que los fragmentos terminales estaban marcados más fuertemente que los internos, lo cual se debe probablemente a que durante el tiempo de incubación están ocurriendo continuamente iniciaciones en ambos extremos del DNA.

Estos resultados sugieren que la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 es capaz de replicar el DNA de $\phi 29$.

En el canal "b" de la Figura 24A se muestra el resultado de un experimento similar realizado en ausencia de proteína terminal (p3) libre. La baja incorporación obtenida (como ya se mostró anteriormente en Resultados (4.2.1)) indica que la proteína p2, en ausencia de proteína p3, es incapaz de utilizar el complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde. Por tanto, la mayoría del marcaje mostrado en el canal "a" se debe a elongación específica del complejo p3-dAMP y no a una reacción de tipo reparación.

4.2.2.3. Papel del factor(es) celular en la elongación del DNA de Ø29

Se ha demostrado en Resultados (4.1.1) que algún factor(es) de la célula huésped estimula fuertemente la formación del complejo de iniciación p3-dAMP, en presencia de proteínas p2 y p3 purificadas y utilizando complejo p3-DNA de Ø29 como molde. Para determinar si este factor(es) celular tiene algún efecto en la elongación del complejo p3-dAMP, se realizó un experimento similar al descrito en el apartado anterior.

La Figura 24A, canal c, y la Figura 24B, muestran que, cuando se añadió una fracción dadora del factor(es) celular a las proteínas p2 y p3 purificadas, se observó una estimulación en el marcaje de los fragmentos terminales, mientras que los internos se marcaron de un modo similar al obtenido en su ausencia (Fig. 24A, canal a y Fig. 24B). Cuando, en presencia del factor(es) celular y proteína p2 purificada no se añadió la proteína p3, la incorporación fue muy baja (Figura 24A, canal d), indicando también en este caso, que el marcaje mostrado en la Figura 24A, canal c, o en la Figura 24B, se debió a elongación del complejo p3-dAMP.

Por tanto, estos resultados confirman el papel del factor(es) celular en iniciación y sugieren que no está implicado en el proceso de elongación.

4.2.2.4. Origen y dirección de la síntesis de DNA

Cuando se analizó la cinética de aparición de marcaje correspondiente al DNA sintetizado "de novo" en presencia de las proteínas p2 y p3 purificadas y de la fracción dadora del factor(es) celular, utilizando complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde en un ensayo realizado como se describe en Métodos (20.6), se observó que en los cinco primeros minutos de incubación, el marcaje se encontraba preferentemente en los fragmentos B y C (también el fragmento L estaba muy marcado teniendo en cuenta su pequeño tamaño) (Figura 25, canal a); estos fragmentos Hind III son los correspondientes a ambos extremos del DNA de $\phi 29$ (ver Figura 25B). Por el contrario, los fragmentos internos tales como Hind III A, D y E, solo se marcaron a tiempos posteriores (Figura 25, canales b, c y d). Por otra parte, en esta figura se observa que después de 40 minutos de incubación (canal d) la incorporación en un fragmento terminal como el Hind III L sigue siendo lineal, mientras que la marca observada en fragmentos internos parece indicar una limitación en la procesividad de la elongación.

La especificidad del material elongado utilizando el terminador de cadena dideoxi-CTP (Resultados 4.2.2.1), así como el gradiente de marcaje observado en la Figura 24A y B, y los resultados de la cinética de elongación mostrados anteriormente, indican que la replicación

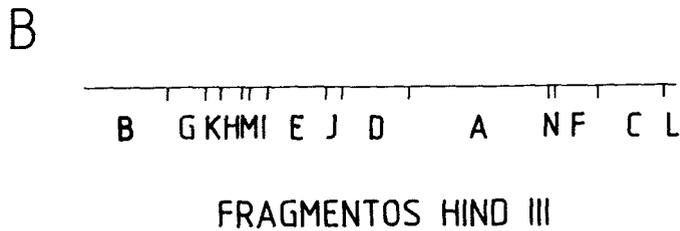


Figura 25. Origen y dirección de la síntesis de DNA. Parte A : se realizó un ensayo de replicación en las condiciones descritas en Métodos (20.6), en presencia de complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde, proteínas p2 (10 ng) y p3 (64 ng) purificadas y una fracción dadora del factor(es) celular (3 μ g). A diferentes tiempos de incubación a 30°C, el DNA marcado se trató con proteínaasa K y Hind III y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida, como se describe en Métodos (21). Después de la electroforesis el gel se secó y se sometió

a autorradiografía. Canales : a, 5 minutos; b, 10 minutos; c, 20 minutos; d, 40 minutos. A la derecha se indica la movilidad electroforética de los fragmentos Hind III del DNA de Ø29. Parte B : Localización de los fragmentos Hind III correspondientes al DNA de Ø29.

"in vitro" del complejo p3-DNA de $\phi 29$ comienza en ambos extremos del DNA (formación del complejo p3-dAMP), progresando en cada caso hacia el extremo opuesto. Por lo tanto, estos resultados, obtenidos utilizando un sistema "in vitro" de replicación, están de acuerdo con el modelo propuesto para la replicación del DNA de $\phi 29$ (58).

4.3. Síntesis "in vitro" de DNA de $\phi 29$ de tamaño unidad

Para determinar si la aparición de marcaje en todos los fragmentos de restricción, correspondiente al ensayo de replicación del complejo p3-DNA de $\phi 29$ realizado en presencia de las proteínas p2 y p3 purificadas (Figura 26, canal a), era debida a elongación total (desde un extremo al otro de la molécula de DNA) del complejo de iniciación p3-dAMP formado en cada extremo del DNA, se realizó un experimento de "pulso y caza" en el que el DNA sintetizado durante 10 minutos en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP, en las condiciones indicadas anteriormente, fue "cazado" a diferentes tiempos por adición de un exceso de dATP "frío". El tamaño del DNA marcado correspondiente a la banda naciente fué analizado, en cada caso, por centrifugación en gradientes alcalinos de sacarosa, como se describe en Métodos (19.1).

La Figura 26 muestra que el DNA marcado durante el "pulso" de 10 minutos en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{-dATP}$ tiene un tamaño medio de $2,2 \times 10^6$ daltons (37% de la longitud del DNA de $\phi 29$). Después de una "caza" de 10 minutos el tamaño aumentó a $3,7 \times 10^6$ daltons (63% de la longitud del DNA de $\phi 29$), y después de 20 minutos de "caza", aproximadamente la mitad de las moléculas de DNA marcadas en el "pulso" alcanzaron la longitud correspondiente a DNA de $\phi 29$ de tamaño unidad ($5,9 \times 10^6$ daltons). Teniendo en cuenta estos datos se puede calcular un valor de aproximadamente 10 nucleótidos/segundo a 30°C para la velocidad de elongación correspondiente a la replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de $\phi 29$, utilizando únicamente la proteína terminal (p3) y la DNA polimerasa de $\phi 29$ (p2).

Por tanto, estos resultados indican que la actividad DNA polimerasa de la proteína p2, en presencia únicamente de proteína terminal (p3) y complejo p3-DNA de $\phi 29$, es capaz de sintetizar "in vitro" moléculas de DNA de tamaño unidad, lo cual sugiere que la proteína p2 podría ser la única DNA polimerasa implicada en la replicación del DNA de $\phi 29$.

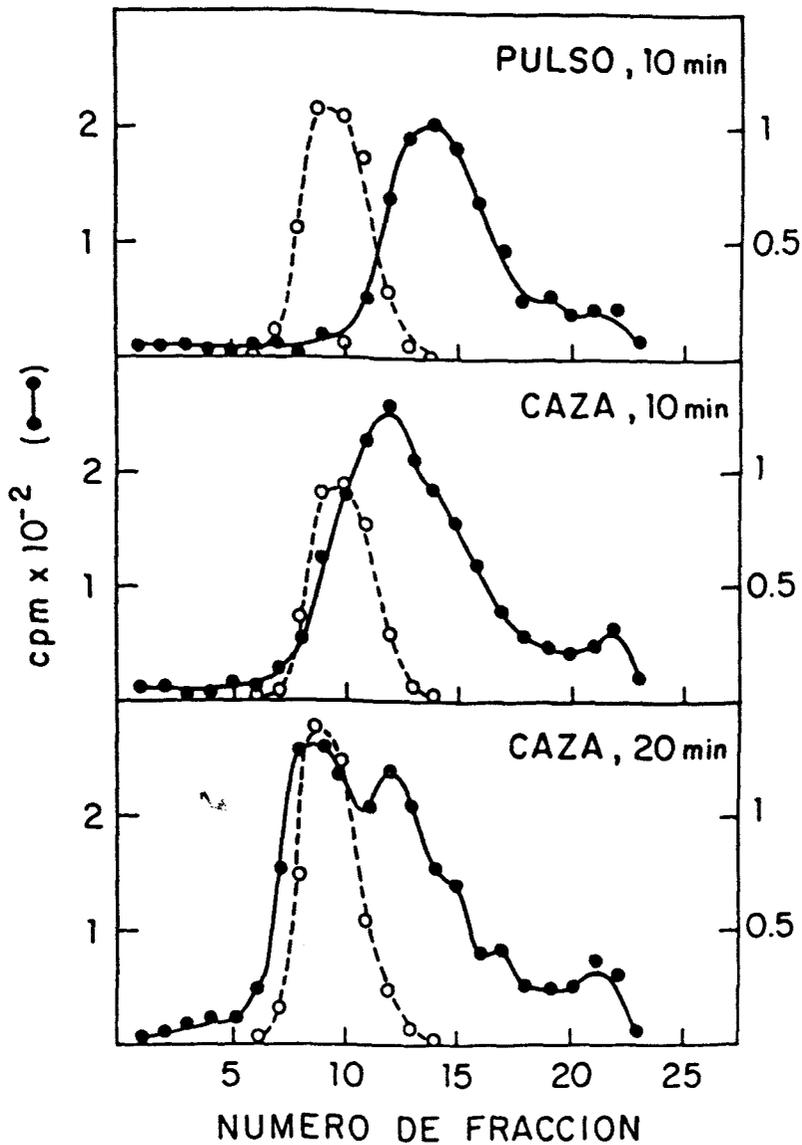


Figura 26. Síntesis "in vitro" de DNA de tamaño unidad en presencia de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (p2) y de la proteína terminal (p3). El DNA marcado con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP $10 \mu\text{M}$ ($5 \mu\text{Ci}$) durante un pulso de 10 minutos en las condiciones del ensayo de replicación descrito en Métodos (20.6), en presencia de complejo p3-DNA de $\phi 29$ ($1 \mu\text{g}$) como molde y proteínas p2 (20 ng) y p3 (128 ng) purificadas, se "cazó" durante 10 y 20 minutos adicionales. Posterior-

mente se desnaturalizó y se sometió a centrifugación en gradientes alcalinos de sacarosa, como se describe en Métodos (19.1). Como marcador de movilidad se utilizó DNA de $\phi 29$ desproteínizado en lugar de complejo p3-DNA, debido a que en estas condiciones, la presencia de proteína terminal no afecta a la posición del DNA en el gradiente. En la figura se representa el DNA marcado con ^{32}P (●—●) y el marcador de DNA de $\phi 29$ (o---o).

4.4. Requerimientos para la replicación "in vitro" del DNA de Ø29. Estimulación por iones NH_4^+

En la Tabla 4 se resumen los requerimientos para el ensayo de replicación "in vitro" del DNA de Ø29, descrito en Métodos (20.6). Se observa que la presencia de las proteínas terminal (p3) y DNA polimerasa de Ø29 (p2), así como la de iones Mg^{+2} , son esenciales para la actividad de replicación. La actividad de replicación es absolutamente dependiente de la utilización de complejo p3-DNA de Ø29 como molde, no pudiendo ser reemplazado por DNA de Ø29 desproteínizado. La eliminación del ATP de la mezcla de reacción descrita en Métodos (20.6) estimuló ligeramente la actividad de replicación; el efecto del ATP en la replicación del DNA de Ø29 será descrito con detalle más adelante. La adición de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ estimuló muy fuertemente la replicación del complejo p3-DNA de Ø29, siendo la concentración óptima 20 mM. Esta estimulación parece específica puesto que, como se observa en la Tabla 4, depende absolutamente de la presencia de proteína p3 libre. Cuando se probaron otras sales en lugar del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ se observó que la adición de ClNH_4 tenía un efecto similar, el ClK estimulaba, aunque en menor grado, y el ClNa fué inactivo.

TABLA 4. Requerimientos para la replicación del DNA de $\phi 29$ con la DNA polimerasa (p2) y la proteína terminal (p3).

<u>Sistema</u>	<u>Actividad</u>
Completo	1
- proteína p3	0.018
- proteína p2	0.01
- complejo p3-DNA de $\phi 29$	0.002
- complejo p3-DNA de $\phi 29$ + DNA de $\phi 29$ (prot. K)	0.001
- Mg^{+2}	0
- ATP	1.3
+ $SO_4(NH_4)_2$ 10 mM	6.6
+ $SO_4(NH_4)_2$ 20 mM	13.4
+ $SO_4(NH_4)_2$ 30 mM	12.9
+ $SO_4(NH_4)_2$ 60 mM	3.9
+ $SO_4(NH_4)_2$ 20 mM - proteína p3	0.02
+ $ClNH_4$ 20 mM	10.2
+ $ClNH_4$ 40 mM	12.3
+ ClK 20 mM	7.2
+ ClK 40 mM	7.9
+ ClNa 20 mM	0.9
+ ClNa 40 mM	0.8

El ensayo de replicación se realizó a 30°C durante 20 minutos en las condiciones descritas en Métodos (20.6).

4.5. Efecto del sulfato amónico

La estimulación por sulfato amónico en el ensayo de replicación del complejo p3-DNA de Ø29 descrita anteriormente, fué analizada con más detalle estudiando su efecto sobre la formación del complejo p3-dAMP (reacción de iniciación) y sobre la elongación del mismo (reacción de elongación).

4.5.1. Sobre la formación del complejo p3-dAMP

Como se ha descrito anteriormente, cuando se incubaron las proteínas p2 y p3 purificadas en presencia de complejo p3-DNA de Ø29, en las condiciones de ensayo de formación del complejo p3-dAMP descritas en Métodos (20.3), la reacción fue muy ineficiente (Figura 27, canal a). Sin embargo, esta reacción fué fuertemente estimulada cuando se añadió $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al ensayo de iniciación, siendo la concentración óptima 20 mM (Figura 27, canales b-e), al igual que en el ensayo de replicación descrito en Resultados (4.4). Por otra parte, como se muestra en esta figura, la adición de una fracción de B. subtilis no infectada (como dador del factor(es) celular) a la reacción conteniendo las proteínas p2 y p3, produjo una estimulación en la formación del complejo p3-dAMP, tanto en ausencia (canal f), como ya se había indicado anteriormente en Resultados (4.1.1), como en presencia (canal g) de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20 mM. Como control adicional se muestra que la adición de SAB (20 µg) no pudo susti-

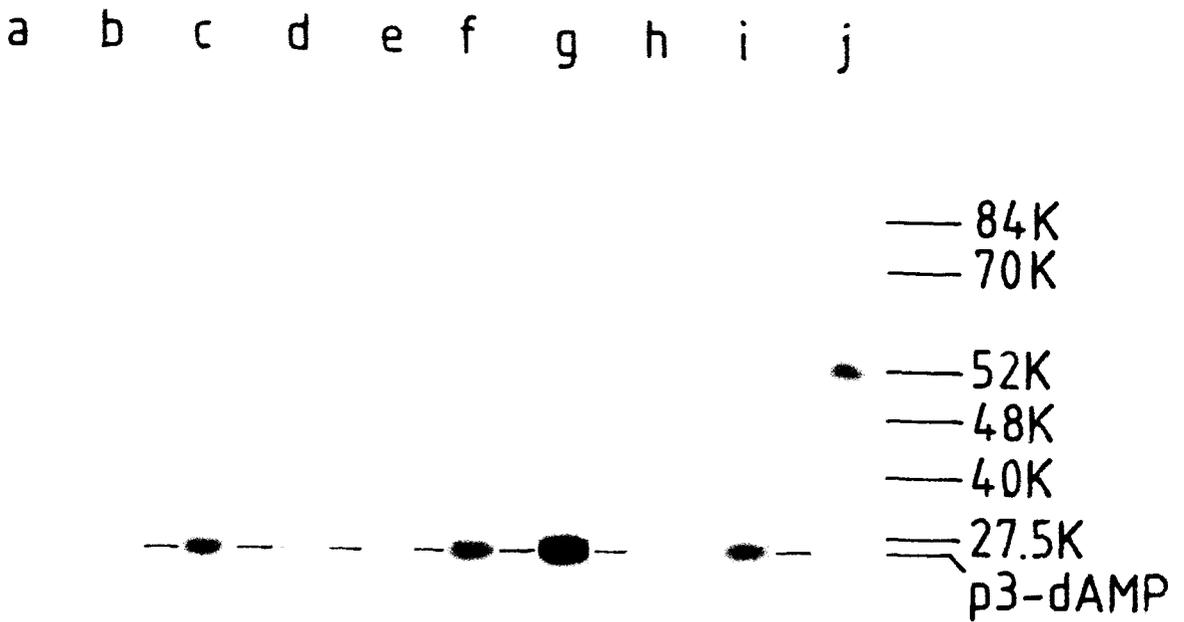


Figura 27. Efecto del sulfato amónico sobre la formación del complejo de iniciación p3-dAMP. Se incubaron 20 minutos a 30°C las proteínas p2 (20 ng) y p3 (300 ng) con complejo p3-DNA de Ø29 (1 µg) como molde, en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 0.25 µM (5 µCi) y con las adiciones indicadas en cada caso, ensayándose la formación del complejo de iniciación p3-dAMP en las condiciones descritas en Métodos (20.3). Canales : a, ninguna adición; b, +SO₄(NH₄)₂ 10 mM; c, +SO₄(NH₄)₂ 20 mM; d, +SO₄(NH₄)₂ 30 mM; e, +SO₄(NH₄)₂ 60 mM; f, + fracción de B. subtilis dadora del factor(es) celular (3 µg); g, como "f", +SO₄(NH₄)₂ 20 mM; h, + SAB (20 µg); i, como "h", +SO₄(NH₄)₂ 20 mM. En el canal "j" se muestran las proteínas estructurales de Ø29 marcadas con ³⁵S. A la derecha se indican los pesos moleculares (expresado en Kilodaltons) de las proteínas correspondientes al canal "j", así como la movilidad electroforética del complejo p3-dAMP. La cuantifica-

ción del complejo p3-dAMP formado se realizó cortando la banda del gel y determinando la radiación Cerenkov. La cantidad de complejo p3-dAMP formado en cada caso se indica a continuación (en fmol) : 0.1 (canal a), 0.28 (canal b), 0.56 (canal c), 0.18 (canal e), 0.54 (canal f), 1.88 (canal g), 0.1 (canal h) y 0.48 (canal i).

tuir al factor(es) celular, ni en ausencia (canal h) ni en presencia (canal i) de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20 mM.

Por lo tanto, estos resultados indican que las proteínas p2 y p3, en ausencia del factor(es) celular, son suficientes para formar el complejo p3-dAMP, si bien los resultados mostrados anteriormente ya lo indicaban, aunque de una forma indirecta, puesto que la elongación del complejo p3-DNA de $\phi 29$ obtenida en presencia de, únicamente, las proteínas p2 y p3 purificadas (Fig. 22) requiere la formación previa del complejo p3-dAMP.

4.5.2. Sobre las cinéticas de iniciación y replicación del DNA de $\phi 29$

La Figura 28 muestra la cinética de formación del complejo de iniciación p3-dAMP en presencia o ausencia de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20 mM. Cuando, en estas condiciones, se analizó la cinética de replicación del complejo p3-DNA de $\phi 29$, se observó un efecto similar. Estos resultados sugieren que el efecto estimulador del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en la replicación del complejo p3-DNA de $\phi 29$ se debe principalmente a su efecto en la reacción de iniciación. Por otra parte, no se observó un efecto significativo del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sobre el valor de la K_m para el dATP ($3 \mu\text{M}$) en la reacción de iniciación "in vitro".

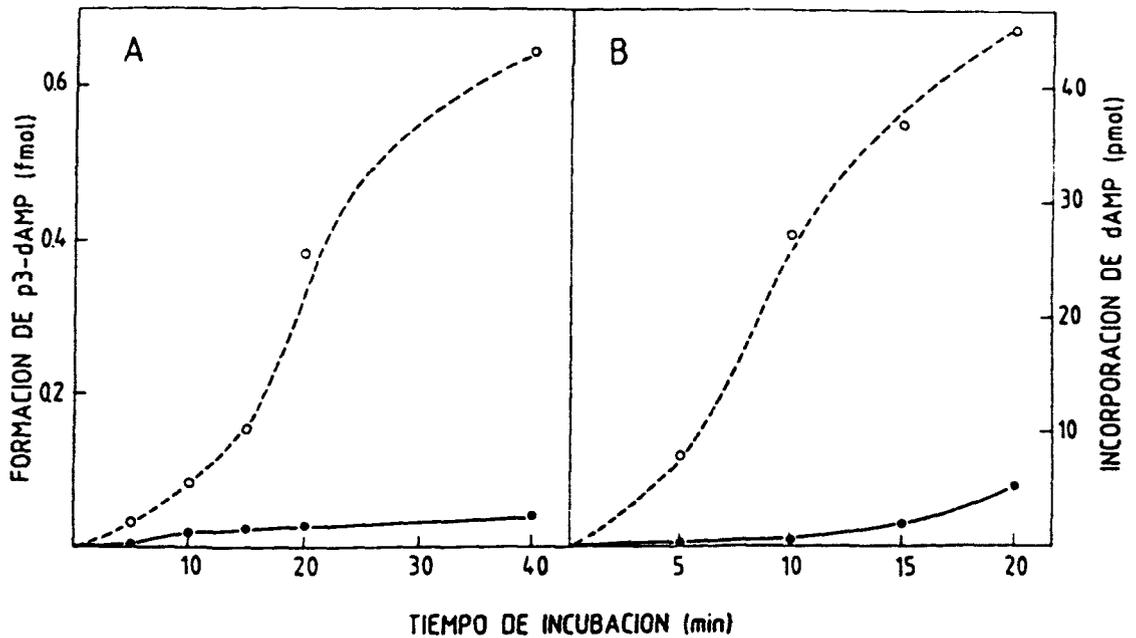


Figura 28. Efecto del sulfato amónico sobre las cinéticas de iniciación y replicación en los ensayos realizados con la DNA polimerasa de $\phi 29$ (p2) y la proteína terminal (p3) en presencia de complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde. Parte A : Se incubaron las proteínas p2 (20 ng) y p3 (300 ng) con complejo p3-DNA de $\phi 29$ (1 μ g) como molde, a 30°C durante los tiempos indicados y en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 0.25 μ M (5 μ Ci), ensayándose la formación del complejo de iniciación p3-dAMP como se describe en Métodos (20.3), en ausencia (●—●) o presencia (○---○) de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20 mM. El complejo p3-dAMP formado se cuantificó cortando la banda del gel y determinando la radiación Cerenkov. Parte B : Se incubaron las proteínas p2 (20 ng) y p3 (300 ng) con complejo p3-DNA de $\phi 29$

(1 μg) como molde a 30°C durante los tiempos indicados y en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 10 μM (2 μCi), ensayándose la actividad de replicación en las condiciones descritas en Métodos (20.6), en ausencia (●—●) ó en presencia (○---○) de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20 mM.

4.5.3. Sobre la elongación "in vitro" del DNA de Ø29

Para estudiar si el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, además de su efecto en la reacción de iniciación, interviene de alguna manera en la elongación de la cadena de DNA, se incubaron las proteínas p2 y p3 con complejo p3-DNA de Ø29 como molde en las condiciones del ensayo de replicación descritas en Métodos (20.6), y en presencia o ausencia de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 10 mM. El DNA marcado con ^{32}P sintetizado "de novo" durante 20 minutos a 30°C , se sometió a análisis de restricción con el enzima Hind III, como se describe en Métodos (21). La Figura 29A, canal a, muestra el nivel de elongación obtenido en ausencia de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. En presencia de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, el nivel de elongación aumentó de modo paralelo en todos los fragmentos de DNA analizados (canal c). Como control, cuando se omitió la proteína terminal (p3) no se detectó incorporación en ningún fragmento, tanto en ausencia (canal b) como en presencia (canal d) de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Cuando se representó la relación entre la radioactividad en el fragmento y el tamaño del mismo, respecto a su localización en el mapa físico del DNA de Ø29 (parte B), se observó que en presencia de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ la velocidad de elongación sólo era ligeramente superior a la existente en su ausencia. La diferencia de incorporación obtenida se explica porque, en presencia de

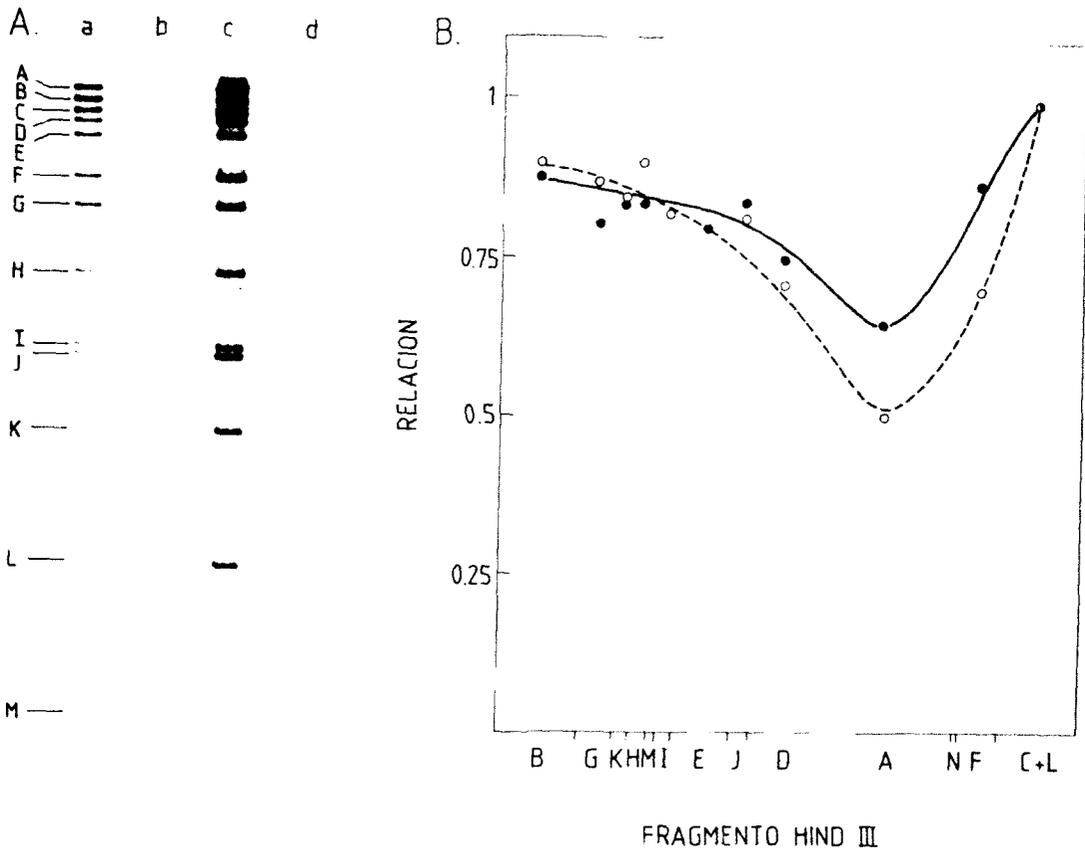


Figura 29. Efecto del sulfato amónico sobre la velocidad de elongación en el ensayo de replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de $\phi 29$. Parte A : El DNA marcado durante 20 minutos a 30°C en el ensayo de replicación descrito en Métodos (20.6), utilizando complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde y proteínas purificadas p2 (20 ng) y p3 (300 ng), en ausencia (canales a y b) ó presencia (canales c y d) de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 10 mM, se trató con proteinasa K y Hind III y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida, como se describe en Métodos (21). Después de la electroforesis el gel se secó y se sometió a autorradiografía.

Canales : a, DNA sintetizado con p2 y p3 (9.048 pmoles de dNMP incorporados); b, DNA sintetizado con p2 (0.072 pmoles de dNMP incorporados); c, DNA sintetizado con p2 y p3 + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 10 mM (31.46 pmoles de dNMP incorporados); d, DNA sintetizado con p2 + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 10 mM (0.144 pmoles de dNMP incorporados). A la izquierda se indica la movilidad electroforética de los diferentes fragmentos Hind III del DNA de $\phi 29$. Parte B : Cada banda mostrada en la parte A (canales a y c) fué cortada del gel, determinándose la radiación Cerenkov. Se representó la relación entre la radioactividad en cada fragmento y el tamaño del mismo, frente a su localización en el mapa físico del DNA de $\phi 29$. Se normalizó a 1 el valor obtenido, en cada caso, para los fragmentos terminales L + C. La incorporación en los fragmentos L + C fué 0.146 y 0.734 pmoles de dNMP en ausencia (o---o) ó presencia (●—●) de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 10 mM, respectivamente.

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ se han iniciado muchas más moléculas de DNA que en su ausencia, si bien en ambos casos la posterior elongación ocurre básicamente a la misma velocidad.

Debido a que en este ensayo de replicación del complejo p3-DNA de $\phi 29$, la iniciación y elongación están acopladas, se diseñó un experimento que permitiese estudiar el efecto del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ únicamente sobre la reacción de elongación. Se incubaron las proteínas p2 y p3 con complejo p3-DNA de $\phi 29$ y en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 10 μM . durante 15 minutos a 30°C para permitir la formación del complejo de iniciación p3-dAMP en ausencia de sulfato amónico. A continuación se añadió IgG anti-p3 para inhibir posteriores iniciaciones y, después de 5 minutos, se añadieron los restantes dNTPs y la incubación se continuó durante 7.5 minutos en ausencia o presencia de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20 mM. El DNA marcado se sometió a análisis de restricción con el enzima Hind III, no observándose diferencia apreciable en el marcaje relativo de los diferentes fragmentos de restricción.

Por lo tanto parece que el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ no afecta de modo apreciable la velocidad de elongación en la replicación "in vitro" del DNA de $\phi 29$. De acuerdo con estos resultados, la velocidad de elongación de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (p2), utilizando DNA activado como molde, solo fué estimulada un factor de 1.5 sobre el control, cuando se ensayó en presencia de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20 mM.

4.6. Papel del ATP en la replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de Ø29

Como se mostró en la Tabla 4, la eliminación del ATP de la mezcla de reacción correspondiente al ensayo de replicación del complejo p3-DNA de Ø29 descrito en Métodos (20.6), produjo una ligera estimulación sobre la actividad control. Este resultado nos obligó a estudiar nuevamente el efecto del ATP sobre las reacciones de iniciación y elongación "in vitro" realizadas con el actual sistema purificado.

Los resultados presentados a continuación indican que el ATP no se requiere en las reacciones de iniciación y elongación "in vitro" del complejo p3-DNA de Ø29, cuando se utiliza un sistema de ensayo con las proteínas p2 y p3 purificadas y el complejo p3-DNA de Ø29, sino que produce un efecto inhibitorio, debido probablemente a competición con el dATP. Estos resultados contrastan con el fuerte requerimiento por ATP en la reacción de iniciación, descrito anteriormente en Resultados (1.4), cuando se utilizaban extractos crudos de B. subtilis infectada con el bacteriófago Ø29. Esta aparente contradicción será examinada con detalle en la Discusión.

4.6.1. Efecto del ATP en la formación del complejo p3-dAMP

Se incubaron las proteínas p2 y p3 con complejo p3-DNA de $\emptyset 29$, en presencia de $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{-dATP}$ $0.25 \mu\text{M}$ y diferentes concentraciones de ATP, ensayándose la formación del complejo de iniciación p3-dAMP como se describe en Métodos (20.3). Como se observa en la Figura 30A, canales a-c, la adición de ATP 1 mM redujo la formación del complejo de iniciación p3-dAMP a un 40% de la obtenida en su ausencia. Sin embargo, cuando se aumentó la concentración del dATP utilizado en la reacción de iniciación hasta $10 \mu\text{M}$, la adición de ATP 1 mM no tuvo efecto apreciable en la reacción de iniciación "in vitro" (Figura 30B, canales a y b).

Estos resultados indican que no se requiere ATP para la formación del complejo p3-dAMP y que el efecto inhibitor observado es debido, probablemente, a competición con el dATP.

4.6.2. Efecto del ATP sobre la elongación del complejo p3-dAMP

Para estudiar si se requería ATP durante la elongación del complejo p3-dAMP se incubaron las proteínas p2 y p3 purificadas, con complejo p3-DNA de $\emptyset 29$ en las condiciones de ensayo descritas en Métodos (20.7). Previamente la mezcla fué incubada con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{-dATP}$

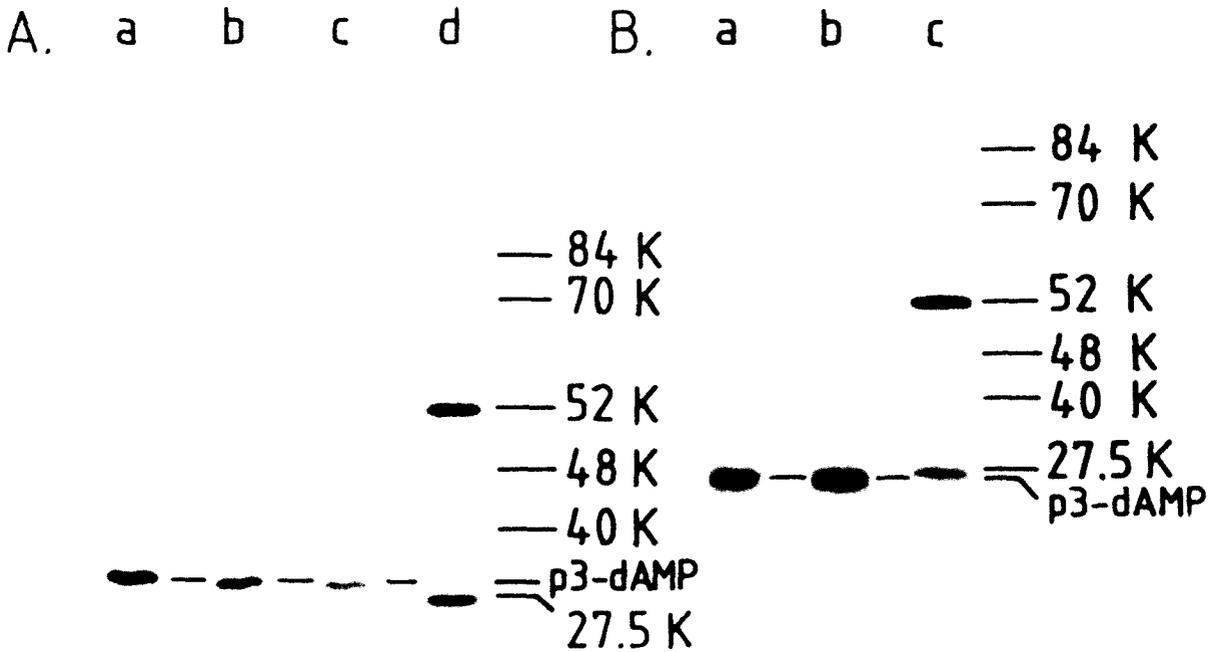


Figura 30. Efecto del ATP en la formación del complejo de iniciación p3-dAMP. Parte A : se incubaron las proteínas p2 (20 ng) y p3 (300 ng) durante 20 minutos a 30°C, en presencia de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20 mM, complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde y $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{-dATP}$ 0.25 μM (5 μCi) en ausencia de ATP (canal a) o en presencia de 0.1 mM (canal b) ó 1 mM (canal c) ATP, ensayándose la formación del complejo de iniciación, p3-dAMP como se describe en Métodos (20.3). En el canal "d" se muestran las proteínas estructurales de $\phi 29$ marcadas con ^{35}S . Parte B : Se realizó un experimento similar al descrito en la parte A, pero con $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{-dATP}$ 10 μM (10 μCi) en ausencia (canal a) o presencia (canal b) de ATP 1 mM. En el canal "c" se muestran las proteínas estructurales

de Ø29 marcadas con ^{35}S . En ambas partes, y a la derecha, se indican los pesos moleculares (expresado en Kilodaltons) de las proteínas correspondientes a los canales "d" (parte A) y "c" (parte B), así como la movilidad electroforética del complejo p3-dAMP.

0.25 μM (5 μCi) para permitir la formación del complejo de iniciación p3-dAMP, en ausencia de ATP. Después de 10 minutos se añadieron los dNTPs así como IgG anti-p3 para inhibir posteriores iniciaciones, continuándose la incubación durante 10 minutos en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de ATP. El DNA marcado se sometió a análisis de restricción con el enzima Hind III, como se describe en Métodos (21).

La Figura 31 muestra que todos los fragmentos de restricción se marcaron de un modo similar en ausencia de ATP (canal a) o en presencia de 0.1, 0.3 o 1 mM ATP (canales b-d), indicando que la presencia de ATP no produce ningún efecto sobre la velocidad de elongación. Esta conclusión se confirmó por cuantificación de la radioactividad presente en cada banda del gel.

4.7. Efecto de las drogas Aphidicolina y BuAdATP sobre la replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de ϕ 29

Se ha demostrado que la droga aphidicolina es un inhibidor de la síntesis de DNA de ϕ 29 tanto "in vivo" (109) como "in vitro" (82,110). Por tanto nos planteamos estudiar el efecto de esta droga, así como el de la droga BuAdATP, ambas inhibidoras de la DNA polimerasa α eucariótica, sobre nuestro sistema "in vitro" de replicación basado en la presencia de las proteínas p2 y p3 purificadas.

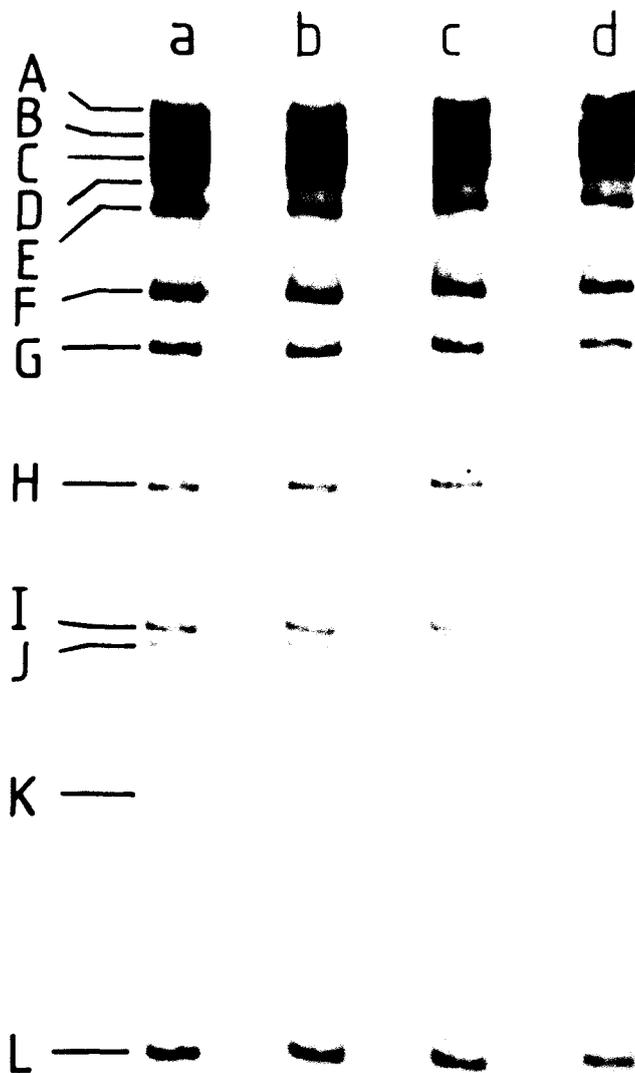


Figura 31. Efecto del ATP en la elongación del complejo p3-dAMP. Se incubaron las proteínas p2 (20 ng) y p3 (300 ng) con complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde durante 10 minutos a 30°C en presencia de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20 mM y $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP 0.25 μM , (5 μCi) y en ausencia de ATP. A continuación se añadió IgG anti-p3 (24 μg) para inhibir posteriores iniciaciones, así como dATP 10 μM y dCTP/dGTP/TTP 20 μM (cada uno), y la reacción se continuó durante 10 minutos, en ausencia (canal a) ó presencia de 0.1 mM (canal b), 0.3 mM (canal c) ó 1 mM (canal d) ATP. Las muestras se trataron con proteinasa K y Hind III

y se sometieron a electroforesis en geles de poli-acrilamida, como se describe en Métodos (21). Después de la electroforesis, el gel se secó y se sometió a autorradiografía. La cuantificación se realizó cortando las bandas del gel y determinando la radiación Cerenkov.

Como se observa en la Figura 32, la actividad de replicación del complejo p3-DNA de ϕ 29 ensayada en presencia de las proteínas p2 y p3 purificadas (como se describe en Métodos (20.6)), fué fuertemente inhibida en presencia de las drogas Aphidicolina y BuAdATP. El nivel de inhibición producido por la Aphidicolina fué similar tanto al obtenido "in vivo" (109) como a otros descritos anteriormente utilizando sistemas "in vitro" menos purificados (82,110).

Con objeto de estudiar si el efecto inhibitor sobre la actividad de replicación se debía a un efecto directo de las drogas sobre la proteína p2, se realizó un ensayo de DNA polimerasa en las condiciones descritas en Métodos (20.4); en presencia de las drogas Aphidicolina y BuAdATP, la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 (ensayada con DNA activado o poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈) fué inhibida sensiblemente, aunque el porcentaje de inhibición fué inferior al observado en el ensayo de replicación descrito anteriormente.

Estos resultados indican que la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 es sensible a las drogas Aphidicolina y BuAdATP, y sugieren que ésta es la causa de la inhibición en la replicación del DNA de ϕ 29 observada "in vivo" e "in vitro". Como se verá más adelante, ambas drogas inhibieron la actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5' de la proteína p2, por lo que quedará claro que el efecto inhibitor incide directamente sobre esta proteína.

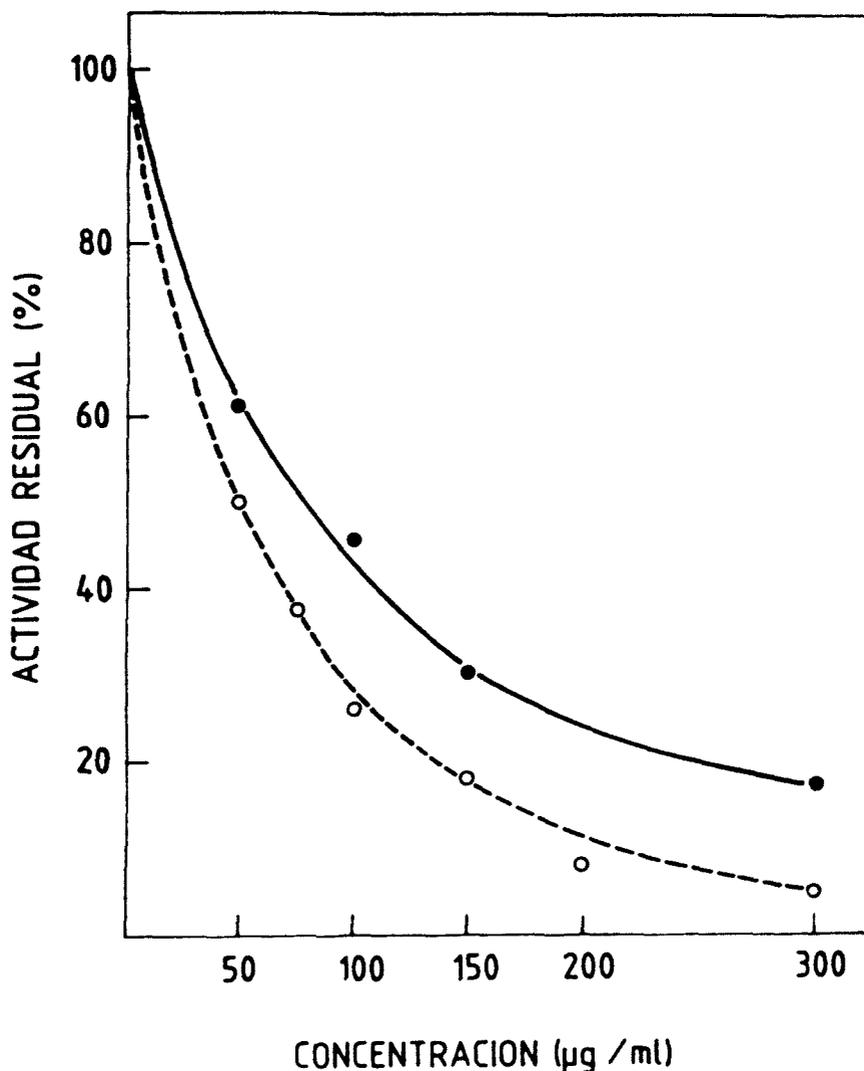


Figura 32. Efecto de las drogas Aphidicolina y BuAdATP sobre la replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de Ø29. Se incubaron las proteínas p2 (20 ng) y p3 (300 ng) con complejo p3-DNA de Ø29 como molde, durante 20 minutos a 30°C en las condiciones del ensayo de replicación descrito en Métodos (20.6), y en presencia de distintas concentraciones de las drogas Aphidicolina (●—●) y BuAdATP (o---o). Las muestras se pasaron por minicolumnas de Sephadex G-50 para eliminar el $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP no incorporado, determinándose a continuación la radiación Cerenkov correspondiente al volumen excluido.

5. Actividad exonucleasa de la proteína p2

Todas las DNA polimerasas conocidas de organismos procarióticos, además de su actividad polimerasa, poseen una actividad exonucleasa que actúa en dirección $3' \rightarrow 5'$ (2). Se ha postulado que esta actividad es un componente de la maquinaria de la DNA polimerasa, esencial para reconocer la existencia del apareamiento correcto de bases en el extremo del "primer" : cuando el nucleótido terminal de la cadena en crecimiento está desapareado, éste ocupa un sitio tal que el enzima puede hidrolizarlo y por tanto eliminarlo (2). De esta manera, la fidelidad en la copia del molde será mayor como resultado de los dos pasos en los cuales el enzima es capaz de reconocer el apareamiento de bases : el primer paso es aquel en que el enzima determina si el extremo del "primer" está debidamente apareado; el segundo paso consiste en la selección del nuevo nucleótido que ha de adicionarse a la cadena. Por lo tanto, la existencia de actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ garantiza, en cierta medida, que la polimerización tendrá lugar con exactitud y por tanto que habrá una lectura correcta de las instrucciones del molde.

Como se ha descrito anteriormente, la proteína p2 parece ser la única DNA polimerasa encargada de la replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$, por lo que nos

planteamos estudiar si esta nueva DNA polimerasa proca-
riótica, como predice la norma general, posee actividad
exonucleotídica 3' → 5' sobre DNA de banda simple,
que asegure la fidelidad del proceso de replicación.

5.1. Actividad exonucleasa 3' → 5' sobre DNA de cadena sencilla

Para determinar si la DNA polimerasa de Ø29
tenía actividad exonucleotídica y, en caso positivo,
cual era la dirección de la digestión, se utilizó como
sustrato fragmentos de restricción de DNA marcados con
³²P en el extremo 3' o en el extremo 5' según se indica
en Métodos (20.8).

Cada fragmento marcado, ya en forma nativa o
bien desnaturalizada (obtenida por ebullición a 100°C
durante 10 minutos) se incubó con proteína p2 purifi-
cada determinándose, a diferentes tiempos de incubación,
la radioactividad soluble en etanol. Como se observa
en la Figura 33A, utilizando DNA marcado en el extremo
3' como sustrato, solo en el caso de utilizarlo desnatu-
ralizado se produjo liberación de radioactividad soluble
en etanol, la cual incrementaba con el tiempo de incuba-
ción con la proteína p2. Cuando se utilizó DNA marcado
en el extremo 5' no se produjo liberación de radioacti-
vidad soluble en etanol en ninguno de los casos (Figura
33B).

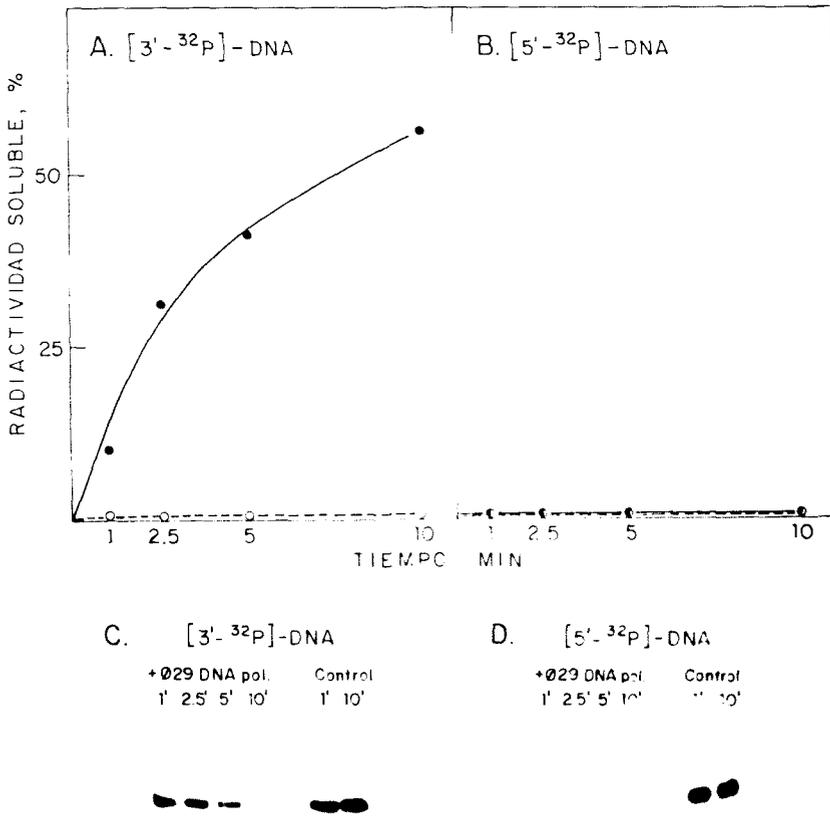


Figura 33. Actividad exonucleasa 3' → 5' de la DNA polimerasa de Ø29. Se incubó proteína p2 purificada (10 ng) con : (A) DNA marcado en el extremo 3' con {α-³²P}-dideoxi ATP (5.000 cpm, 26 ng de DNA); (B) DNA marcado en el extremo 5' con {γ-³²P}-ATP (5.000 cpm, 13 ng de DNA), como se describe en Métodos (20.8) y a los tiempos indicados se determinó la radioactividad soluble en etanol. o---o indica DNA nativo y ●—● indica DNA desnaturalizado. En las partes (c) y (D) se

muestra un análisis electroforético y autorradiografía de la radioactividad insoluble en etanol correspondiente a las incubaciones con DNA desnaturalizado mostradas en (A) y (B) respectivamente, llevado a cabo como se indica en Métodos (17.2.2). También se sometieron a electroforesis controles de ambas muestras incubadas en ausencia de proteína p2. Los fragmentos de DNA marcados en 3' o en 5' tenían una longitud de 600 y 900 nucleótidos respectivamente.

Estos resultados sugerían que la proteína p2 tiene actividad nucleasa en dirección 3' → 5'. De acuerdo con esto, cuando el material insoluble en etanol correspondiente a los ensayos con DNA desnaturado se analizó por electroforesis en geles de poli-acrilamida y autorradiografía, se observó, en el caso del DNA marcado en 3', la presencia de una banda de intensidad decreciente en la misma posición del control incubado en ausencia de proteína p2 (Figura 33,C). Sin embargo, cuando se usó DNA marcado en 5', el material insoluble en etanol decrecía en tamaño con el tiempo de incubación (Figura 33D) indicando el resultado, también en este caso, la existencia de una actividad nucleasa en dirección 3' → 5' sobre DNA de cadena sencilla.

5.2. Caracterización del material hidrolizado como deoximononucleótidos

La actividad exonucleasa 3' → 5' sobre DNA de cadena sencilla capacita a la DNA polimerasa para corregir sus propios errores de polimerización eliminando los nucleótidos mal apareados. Esta actividad, para ser realmente eficaz, ha de funcionar de modo inmediato y cada vez que actúa debe liberar únicamente un residuo de 5' -deoximononucleótido. Una degradación más drástica, al nivel de oligonucleótidos, no supondría ninguna ventaja sino más bien un inconveniente, puesto

que polimerizar de nuevo el oligonucleótido degradado como consecuencia de un sólo error de copia, supondría a la larga un grave retraso en la replicación del genoma.

Este comportamiento teórico, que se cumple en la práctica para el caso de la DNA polimerasa I de E. coli y las DNA polimerasas de los bacteriófagos T4 y T7, y que caracteriza una actividad nucleasa 3' → 5' como exonucleotídica, fué estudiado para el caso de la DNA polimerasa del bacteriófago Ø29 analizando la naturaleza y tamaño del producto de hidrólisis de la actividad nucleásica 3' → 5'.

Se incubó DNA desnaturalizado, marcado con $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ -dATP en el extremo 3', con proteína p2 y, a diferentes tiempos de incubación, se analizó la radioactividad soluble liberada. Como se observa en la Figura 34, la radioactividad hidrolizada fué caracterizada como 5'-dAMP por cromatografía en capa fina, tal como se describe en Métodos (18.2). Se observa que incluso a tiempos muy cortos de incubación el material liberado es 5'-dAMP y no oligonucleótidos, lo que demuestra que la actividad nucleasa 3' → 5' sobre DNA de banda simple de la DNA polimerasa de Ø29 es exonucleolítica.

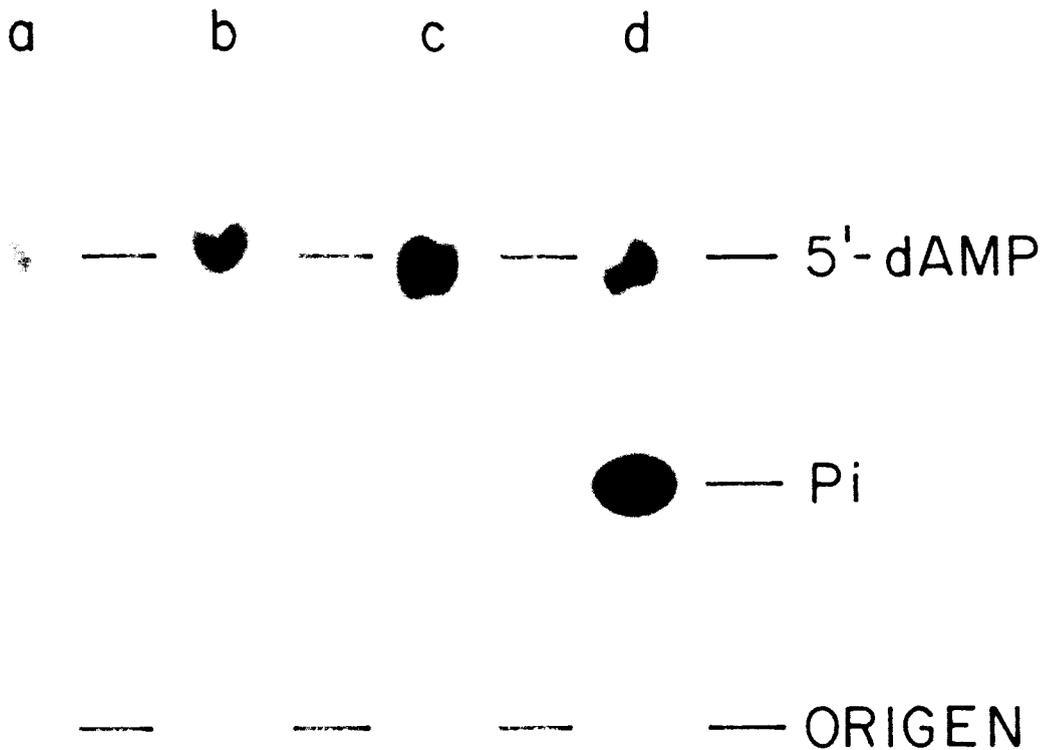


Figura 34. Caracterización del material nucleotídico hidrolizado en presencia de proteína p2. Se preparó {3'-³²P}-DNA por marcaje con {α-³²P}-dATP (4.000 cpm, 0.7 ng de DNA), posteriormente se desnaturalizó por ebullición a 100°C durante 10 minutos y se incubó con 20 ng de proteína p2 purificada durante 1, 2.5 y 10 minutos como se describe en Métodos (20.8), determinándose la radioactividad soluble en etanol. Una alícuota de cada fracción se aplicó a una placa de poli-etilennimina-celulosa (PEI-celulosa). El cromatograma se desarrolló con formiato de litio 0.15 M, pH 3.0 corriéndose en todos los casos 5'-dAMP "frío" como

marcador interno. Después de determinar la posición del marcador con luz ultravioleta, el cromatograma se sometió a autorradiografía. La figura muestra el autorradiograma en el que se observa, en todos los casos, la comigración del marcador 5'-dAMP y el material hidrolizado correspondiente a : a) 1 min; b) 2.5 min; c) 10 min; d) como (b) + ^{32}Pi como marcador.

5.3. Asociación de las actividades de replicación y exonucleasa 3' → 5' de la DNA polimerasa de Ø29

Todas las DNA polimerasas de organismos procarióticos actúan asociadas con una actividad exonucleásica 3' → 5' que, "comprobando la lectura", asegura la fidelidad de la replicación. Esta actividad exonucleásica se ha demostrado ser parte integrante de la cadena polipeptídica de la DNA polimerasa en el caso de la DNA polimerasa I de E. coli (4); DNA polimerasa de T4 (4, 111); DNA polimerasa de T7 (112); DNA polimerasa inducida por el citomegalovirus humano (113); DNA polimerasa inducida por el virus Herpes simplex (114-116) y como excepción, en la DNA polimerasa (é) eucariótica (117).

Por lo tanto, era importante determinar si la actividad exonucleásica 3' → 5' presente en la fracción purificada de la proteína p2 era parte integrante de la DNA polimerasa o bien correspondía a alguna especie minoritaria contaminante.

5.3.1. Coinactivación térmica

Como primer criterio de asociación se examinó la estabilidad al calor de las actividades de replicación de p3-DNA y exonucleásica 3' → 5' sobre DNA de cadena sencilla, presentes en la fracción purificada de proteína p2.

La fracción purificada de proteína p2 (86% pura) correspondiente al eluido con 0.4 M de la columna de fosfocelulosa, fué preincubada a 42°C, y a diferentes tiempos de preincubación se ensayaron sus actividades replicación de p3-DNA y exonucleasa 3' → 5' sobre DNA de cadena sencilla. Como se observa en la Figura 35 y, al igual que ocurre en el caso de la DNA polimerasa del bacteriófago T7 (112), DNA polimerasa inducida por el citomegalovirus humano (113), y DNA polimerasa (δ) de mamíferos (117), ambas actividades DNA polimerasa y exonucleasa fueron inactivadas con idéntica cinética, sugiriendo una asociación entre la actividad exonucleásica y la DNA polimerasa viral.

5.3.2. Cosedimentación en gradiente de glicerol

Otra evidencia adicional de que ambas actividades DNA polimerasa y exonucleasa 3' → 5' estaban realmente asociadas, se obtuvo sometiendo la fracción purificada de proteína p2 a centrifugación en gradiente de glicerol y valorando ambas actividades en cada una de las fracciones del gradiente, como se describe en Métodos (19.2, 20.6 y 20.8).

Como se observa en la Figura 36A, la actividad DNA-polimerasa asociada a la proteína p2 cosedimentó con la actividad exonucleasa 3' → 5' en una posición del gradiente que correspondía a un peso molecular de

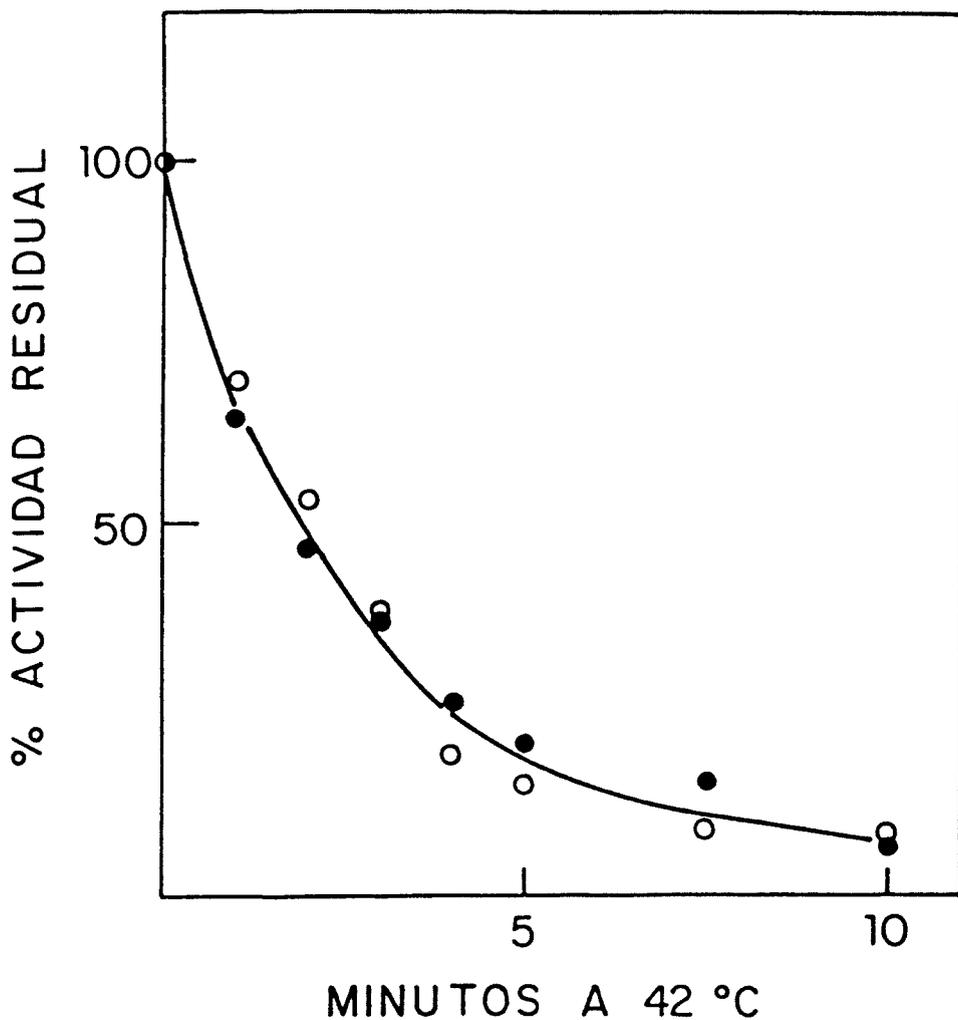
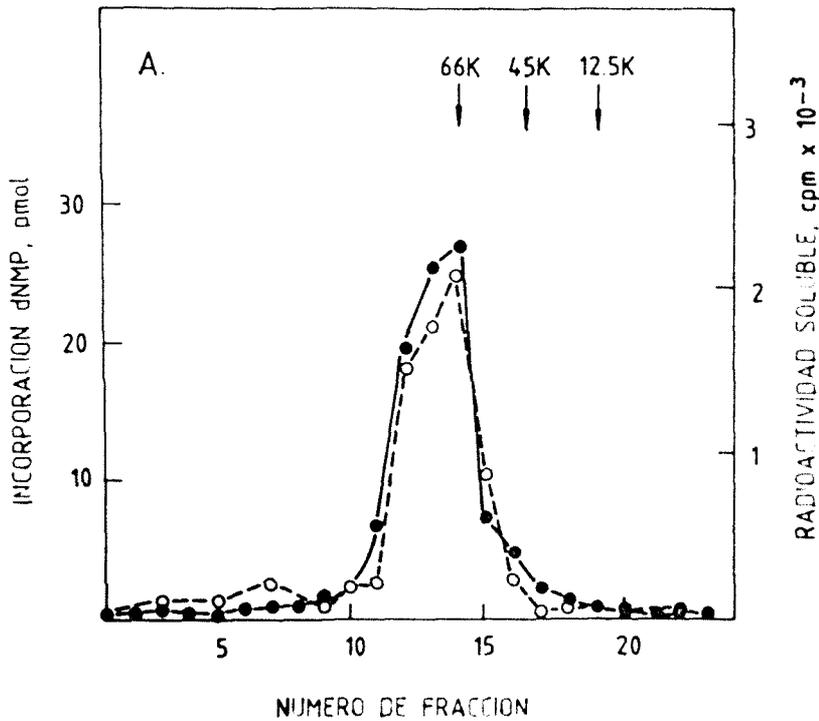


Figura 35. Coinactivación de las actividades de replicación y exonucleasa 3' → 5' de la DNA polimerasa de Ø29. Se incubó proteína p2 purificada (fracción de fosfocelulosa) en una solución conteniendo 25 mM Tris-ClH, pH 7, 0.2 M ClNa, 50% glicerol y SAB (1 mg/ml), a una temperatura de 42°C. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 20 ng de proteína p2 que fueron ensayadas en actividad de replicación del complejo p3-DNA de Ø29 y en actividad exonucleasa 3' → 5' sobre DNA de cadena sencilla, como se describe en Métodos (20.8). (○—○) indica actividad de replicación y (●—●) indica actividad exonucleasa.



B.

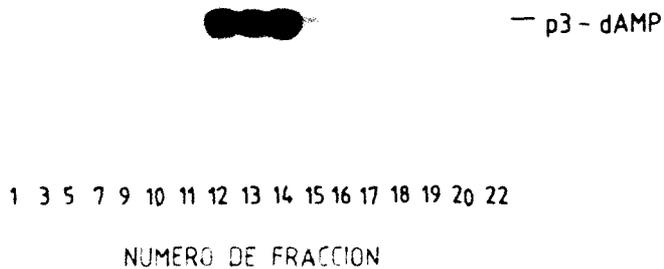


Figura 36. Centrifugación en gradiente de glicerol de la DNA polimerasa de Ø29. Se sometieron 2.4 µg de proteína p2 purificada a centrifugación en un gradiente de glicerol del 15% al 30% (v/v), como se describe en Métodos (19.2). Se añadieron 50 µg de ovoalbúmina y citocromo C como marcadores de peso molecular. Transcurrida la centrifugación se tomaron fracciones y una alícuota de cada fracción se utilizó para ensayar las actividades de iniciación, replicación y exonucleasa 3' → 5', como se describe en Métodos (20.3, 20.6 y

20.8). Parte A : Actividad DNA polimerasa sobre el complejo (proteína p3-DNA) de $\phi 29$ como molde (indicado como ●—●) y actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5' (indicado como (o---o)) utilizando {3'-³²P}-DNA desnaturado preparado por marcaje con { α -³²P}-dATP (4.000 cpm, 0.7 ng de DNA). Parte B : formación del complejo de iniciación p3-dAMP. Las flechas indican la posición de los marcadores protéicos.

68.000 daltons, que como se ha visto anteriormente por ensayo de renaturalización "in situ", es el tamaño de la DNA polimerasa de $\phi 29$ codificada por el gen 2. Además, y como control de la actividad de iniciación de la proteína p2, la Figura 36B, muestra que la actividad de iniciación, ensayada en la formación del complejo p3-dAMP, estaba presente en el mismo pico de proteína p2.

Por lo tanto se concluye que las 3 actividades : INICIACION, DNA POLIMERASA Y EXONUCLEASA 3' \longrightarrow 5' forman parte intrínsecamente de la proteína p2.

5.4. Efecto de las drogas Aphidicolina y BuAdATP sobre la actividad exonucleasa 3' \longrightarrow 5' de la proteína p2

Como se mostró anteriormente, la replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de $\phi 29$ así como la actividad DNA polimerasa de la proteína p2, fueron inhibidas en presencia de las drogas Aphidicolina y BuAdATP. Cuando se ensayó el efecto de estas drogas sobre la actividad exonucleasa 3' \longrightarrow 5' asociada a la proteína p2, se observó una fuerte inhibición en ambos casos (Figura 37).

Por tanto, el conjunto de estos datos y los descritos anteriormente en Resultados (4.7), indican que los efectos inhibidores sobre las actividades de replicación, DNA polimerasa y exonucleasa 3' \longrightarrow 5', se deben

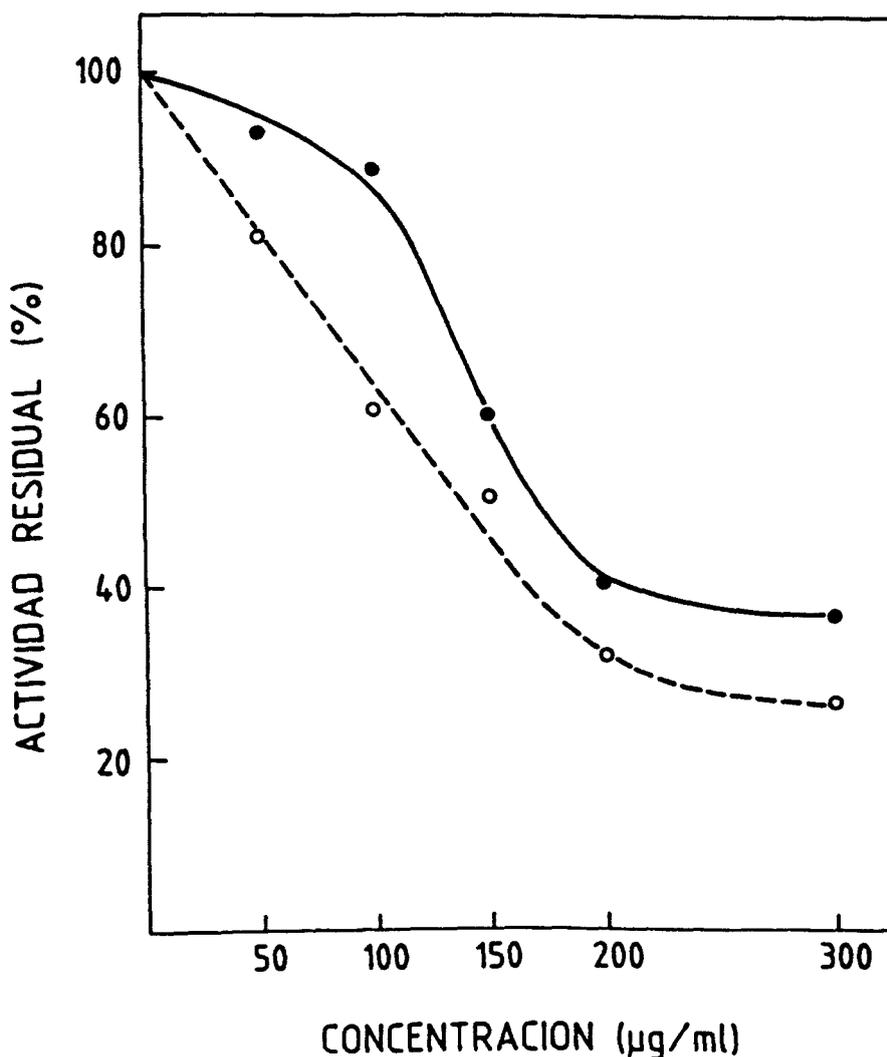


Figura 37. Efecto de las drogas Aphidicolina y BuAdATP sobre la actividad exonucleasa 3' → 5' de la proteína p2. Se incubó proteína p2 purificada (20 ng) con {3'-³²P}-DNA desnaturalizado (5.000 cpm, 0.9 ng), en las condiciones del ensayo de actividad exonucleasa descritas en Métodos (20.8), y en presencia de distintas concentraciones de las drogas Aphidicolina (●—●) y BuAdATP (o---o). Después de 20 minutos de incubación se determinó la radioactividad soluble en etanol.

a una acción directa de las drogas sobre la proteína p2.

5.5. Requerimientos y magnitud de la actividad exonucleasa 3' → 5' de la DNA polimerasa de Ø29

Como se indica en la Tabla 5, cuando se omitió el Mg^{++} de la mezcla de reacción, la actividad exonucleasa se redujo a menos de un 1%; en ausencia de β -mercaptoetanol, la actividad se redujo ligeramente y la ausencia de ATP no tuvo efecto negativo sobre la actividad control. La adición de otros componentes utilizados en el ensayo de replicación tales como espermidina, glicerol y SAB, tampoco presentaron ningún efecto. Sin embargo, la sal sí afectó a la actividad exonucleásica : como se observa en la Tabla 5, la adición de ClK 0.35 M resultó en un 85% de inhibición sobre la actividad del control. La presencia de deoxi-ribo-o ribonucleósidos-5'-(trifosfato o monofosfato) no supuso cambios esenciales en la actividad exonucleásica.

Para hacernos una idea de la magnitud de la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa de Ø29, se utilizó como sustrato 25 ng de DNA de Ø29 desnaturalizado y marcado uniformemente. De esta manera se obtuvo un valor de 23 fmoles de nucleótido hidrolizado/minuto/ng de proteína p2.

TABLA 5. Requerimientos de la actividad exonucleasa 3' → 5' de la DNA polimerasa de Ø29.

<u>Sistema</u>	<u>Actividad, %</u>
Completo	100
- Mg ⁺⁺	0.7
- 2-mercaptoetanol	72
- ATP	114
+ 1 mM espermidina + 5% (v/v) glicerol + SAB (0.1 mg/ml)	100
+ ClK 0.15 M	65
+ ClK 0.25 M	35
+ ClK 0.35 M	15
+ dATP, dGTP, dCTP, dTTP	83
+ ATP, GTP, CTP, UTP	102
+ dAMP, dGMP, dCMP, dTMP	103
+ AMP, GMP, CMP, UMP	103

Los ensayos de exonucleasa se llevaron a cabo con {3'-³²P}-DNA, desnaturalizado por calor y marcado con {α-³²P}-dATP (5.000 cpm, 12 ng de DNA), en las condiciones indicadas en Métodos (20.8) en presencia de 20 ng de proteína p2. 100% de actividad representa la hidrólisis de 3.500 cpm. Los nucleótidos fueron añadidos a una concentración de 30 μM cada uno.

La actividad polimerizadora de la proteína p2 ensayada con el molde-"primer" poli(dA)-(dT)₁₂₋₁₈ fué de 30 fmoles de dTMP incorporado/minuto/ng de proteína p2. Cuando se utilizó como molde complejo de Ø29 en el ensayo de replicación que se describe en Métodos (20.6), la actividad de la DNA polimerasa fué 285 fmoles de nucleótido incorporado/minuto/ng de proteína p2. Este último valor podría ser incluso superior puesto que, probablemente, el paso limitante en el ensayo de replicación es la formación del complejo de iniciación p3-dAMP.

D I S C U S I O N

El bacteriófago $\phi 29$ se replica mediante un nuevo mecanismo de iniciación que se basa en la presencia de una proteína covalentemente unida a ambos extremos 5' de la molécula de DNA que forma su genoma.

Esta proteína terminal, debido a su papel de "primer" en la iniciación de la replicación del DNA viral, ofrece una original solución al problema de la iniciación en los extremos 5' de genomas lineales : Una nueva molécula de esta proteína constituirá el primer eslabón a partir del cual se irá engarzando la cadena polinucleotídica naciente.

La existencia de nuevos mecanismos y funciones ha de suponer igualmente la existencia de nuevos sustratos y enzimas específicas capaces de desempeñarlas, y por lo tanto, el bacteriófago $\phi 29$ ha de utilizar una buena parte de su pequeña cantidad de información genética en codificar estas nuevas funciones que le aseguren la replicación.

De acuerdo con esto se ha demostrado, mediante estudios "in vivo", que los genes 2, 3, 5, 6 y 17 de $\phi 29$ están implicados en la síntesis del DNA viral (107, 62, 63). También se ha demostrado que la proteína unida covalentemente al DNA de $\phi 29$ es una proteína viral, producto del gen 3, y que, de acuerdo con el modelo propuesto está implicada en la replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$ (72).

El desarrollo de un sistema "in vitro" dependiente de extractos de B. subtilis infectada con el bacteriófago $\phi 29$, ha demostrado la formación, de acuerdo con el modelo propuesto, de un complejo covalente entre la proteína p3 y el primer nucleótido 5'-terminal (5'-dAMP), que posteriormente pudo ser elongado específicamente (67). La formación de este complejo p3-dAMP (Reacción de Iniciación) dependía absolutamente de la presencia del complejo p3-DNA de $\phi 29$ como molde, no ocurriendo en el caso de utilizarse DNA de $\phi 29$ tratado con proteinasa K ó en ausencia de DNA (67). Esto demostraba el requerimiento de la proteína p3 paterna en la reacción de iniciación, lo que estaba de acuerdo con experimentos de transfección llevados a cabo en paralelo con complejo p3-DNA de $\phi 29$ y DNA de $\phi 29$ tratado con proteinasa K, en los que se demostró que el complejo p3-DNA de $\phi 29$ fué capaz de transfectar células competentes de B. subtilis mientras que el DNA tratado con proteinasa K resultó inactivo (118). Puesto que el DNA tratado con proteasas es capaz de entrar en la célula, como se demostró por rescate de marcadores (86), la incapacidad para transfectar mostrada por este DNA se debe probablemente a que no puede iniciar la replicación debido a la ausencia de la proteína p3 terminal.

La conclusión de que la proteína p3 unida al DNA paterno es un requerimiento esencial para la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$ también está de acuerdo con los resultados obtenidos de una infección

mixta de B. subtilis, realizada a 42°C, con los mutantes ts2(98) y ts3(132) donde la mayoría de la descendencia tuvo el genotipo ts2 (33).

Sin embargo, los datos existentes hasta el momento no permitían concluir de qué forma está implicada esta proteína terminal unida al DNA en la iniciación de la replicación del DNA de Ø29. ¿Es capaz la proteína p3 paterna de formar un nuevo complejo p3-dAMP que permita la elongación y, por tanto, la síntesis de la cadena hija ó bien, de acuerdo con la facilidad de agregación que presenta esta proteína y como indica el modelo propuesto (58, 59), esta proteína paterna servirá únicamente como punto de interacción con otra molécula de p3 libre, cumpliendo así un perfecto papel de "señalización" del origen de replicación?

En esta tesis se presenta la evidencia de que extractos de B. subtilis infectada con un mutante sus 3 fueron incapaces de formar "in vitro" el complejo de iniciación p3-dAMP, incluso en el caso de ser complementados con complejo p3-DNA de Ø29. Debido a que extractos de células infectadas con el mutante sus 3, incapaz de producir proteína p3, fueron activos en la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP cuando se complementaron con proteína p3 purificada (97), queda demostrado que es la proteína p3 libre, y no la proteína paterna, la que reacciona covalentemente con dATP formando el complejo de iniciación p3-dAMP. Este resultado está

de acuerdo con el hecho de que los intermedios replicativos del DNA de $\phi 29$ tengan proteína p3 asociada a los extremos del DNA, tanto de las cadenas hijas como de las paternas (64).

Con objeto de ver si se requería, además de la proteína p3, algún otro producto génico codificado por $\phi 29$ en la formación del complejo p3-dAMP, se utilizaron extractos de células infectadas con mutantes sensibles a supresor (sus) y sensibles a temperatura (ts) en los cistrones que codifican proteínas necesarias para la síntesis de DNA de $\phi 29$, que por esta razón fueron suplementados en los ensayos "in vitro" con complejo p3-DNA exógeno. Cuando se utilizaron extractos de células infectadas con dos mutantes sus diferentes en el gen 2 no se observó formación de complejo p3-dAMP a menos que se adicionase una fracción de células infectadas con un mutante sus 3 y p3-DNA como molde. Además, extractos preparados a partir de células infectadas a 44°C con un mutante ts 2 fueron inactivos en la formación "in vitro" del complejo de iniciación, pudiendo ser complementados por adición de una fracción de células infectadas con un mutante sus 3 y p3-DNA exógeno. Por otra parte, y tal como se esperaba, extractos de células infectadas a temperatura permisiva con el mutante ts 2 fueron activas en la formación del complejo de iniciación, independientemente de que fuesen o no complementadas con el extracto sus 3 y con p3-DNA exógeno.

Estos resultados indicaron que el producto del gen 2 de $\phi 29$ se requiere para la formación "in vitro" del complejo p3-dAMP, lo que está de acuerdo con el hecho de que "in vivo", el gen 2 está implicado en la replicación del DNA y, concretamente, en un paso de iniciación (72).

También se ha indicado que el producto del gen 2 se requiere "in vivo" para la unión del DNA de $\phi 29$ a la membrana de la célula huésped (100,103), pero este papel parece ser independiente de la función del producto del gen 2 en la reacción de iniciación puesto que no se requieren membranas en la formación "in vitro" del complejo p3-dAMP (67,119).

Cuando se utilizaron extractos de células infectadas con mutantes sus en los genes 6 y 17 de $\phi 29$ en la reacción de iniciación "in vitro", se observó en ambos casos formación de complejo de iniciación p3-dAMP, lo que sugirió que los correspondientes productos génicos no están implicados en la reacción de iniciación. Sin embargo, en lo que respecta al producto del gen 17, hay que considerar que los dos mutantes en el gen 17 utilizados en los experimentos "in vitro" son "leaky" (62,63). Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que se esté sintetizando algo de proteína p17 o bien que alguna proteína bacteriana pueda reemplazarla. Por otra parte, y como se discutirá más adelante, la proteína p6 purificada fué capaz de estimular la formación

del complejo p3-dAMP, en un ensayo de iniciación "in vitro" realizado en presencia de, únicamente, las proteínas p2 y p3 purificadas.

En el caso de utilizar extractos de células infectadas a 42°C con el mutante ts5(219) se observó una actividad formadora de complejo de iniciación similar a la presente en extractos equivalentes infectados por Ø29 tipo salvaje, lo que sugiere la no implicación de la proteína p5 en la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP. Sin embargo, y debido al carácter "leaky" de este mutante y a la no disponibilidad de una mutación sus en el gen 5, la afirmación anterior ha de tomarse con las mismas reservas que en el caso del gen 17, descrito anteriormente.

De todas formas, hay que destacar que los resultados obtenidos "in vitro" con los mutantes sus2, sus3, ts5 y sus6, están de acuerdo con los experimentos "in vivo" que indicaban la implicación de los genes 2 y 3 en la iniciación de la replicación, y la de los genes 5 y 6 en algún paso de elongación o maduración (72).

La formación "in vitro" del complejo de iniciación no fué afectada cuando se utilizaron inhibidores de la DNA girasa, de la DNA polimerasa III de B. subtilis o de la RNA polimerasa, indicando que estas enzimas

celulares no desempeñan ningún papel indispensable en la iniciación de la replicación del DNA viral. Cuando se utilizó en el ensayo de iniciación "in vitro" el inhibidor de la elongación de DNA, dideoxi-dATP, no se observó efecto negativo apreciable sobre la formación del complejo p3-dAMP, sugiriendo no sólo que la iniciación y la elongación son sucesos diferentes en la replicación del DNA de $\emptyset 29$, como había sido indicado anteriormente (67), sino que sugiere también que la reacción de iniciación es muy selectiva para un 2' deoxi-3' hidroxinucleótido, posiblemente debido a la función de este complejo de iniciación en suministrar el grupo 3'-OH libre, necesario para la elongación.

Cuando se utilizaron extractos de B. subtilis infectada con $\emptyset 29$ el ATP fué un requisito importante en la reacción de iniciación "in vitro" (67), aunque pudo ser reemplazado por todos los ribo- y deoxirribonucleósidos trifosfato probados. De modo similar, el ATP es requerido y puede ser reemplazado por dATP, dGTP, GTP y UTP en la formación del complejo de iniciación entre la proteína preterminal de adenovirus y dCMP (120). El ADP también fué activo, aunque en menor medida, en la formación "in vitro" del complejo de iniciación de $\emptyset 29$, mientras que el AMP fué totalmente inactivo. La baja estimulación obtenida en la formación del complejo de iniciación al utilizar análogos no-hidrolizables de ATP, tales como AMP-PNP y AMP-PCP, sugería el requerimiento

de hidrólisis de ATP durante la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$.

Sin embargo, y como se discutirá más adelante, este requerimiento por nucleótidos parece ser intrínseco de la crudeza de los extractos, no siendo, en un sistema más purificado, un requisito para la reacción de iniciación "in vitro".

Hasta aquí los resultados obtenidos indicaban que la reacción de iniciación "in vitro" requería al menos dos proteínas virales : la proteína terminal (p3) y el producto del gen 2. Ambas proteínas se sintetizan a tiempos tempranos después de la infección. Con objeto de caracterizar estas dos proteínas y averiguar si eran necesarias otras proteínas virales o celulares, para la formación del complejo p3-dAMP, nos planteamos en nuestro laboratorio la purificación de las proteínas p3 y p2.

La proteína p3, que es la proteína unida al DNA de $\phi 29$, ha sido clonada, sobreproducida y purificada a homogeneidad en nuestro laboratorio (76,97).

Con objeto de purificar y caracterizar la proteína p2, y debido a la baja cantidad sintetizada en células de B. subtilis infectadas por $\phi 29$, el fragmento de restricción Hind III-B del DNA viral, conteniendo el gen 2, fué clonado primeramente en el plásmido pBR322 y posteriormente bajo el control del promotor P_L del bacteriófago λ , contenido en el plásmido pPLc28 (80).

El plásmido pPLc28, que es un derivado del plásmido pBR322, lleva la secuencia del promotor P_L del bacteriófago λ insertada de tal modo que la transcripción que depende de él, tiene lugar en la dirección de movimiento de las agujas del reloj. En esta misma dirección, y muy próximo al promotor P_L , el plásmido posee un fragmento "linker" o "conector", con dianas únicas para las endonucleasas de restricción Eco RI, Bam HI y Hind III, en este orden, de modo que cualquier fragmento de DNA insertado en cualquiera de estos sitios de restricción será expresado eficientemente en E. coli, siempre que posea su propia secuencia de unión a ribosomas y el triplete ATG iniciador. De esta manera, y como se indica en Resultados (2.1), se obtuvo el plásmido recombinante, conteniendo el gen 2, pLBw2.

Para controlar la expresión de la proteína p2, dependiente del promotor P_L contenido en el plásmido pLBw2, se eligió como huésped la estirpe de E. coli K-12 Δ H1 Δ trp, que es un lisógeno de λ con una mutación ts en el gen del represor. De esta manera es posible mantener genes letales en potencia en la bacteria, puesto que éstos no podrán ser expresados excepto después de inducción térmica del promotor P_L . En este caso, cuando la estirpe de E. coli K-12 Δ H1 Δ trp, transformada con el plásmido recombinante pLBw2, fué inducida térmicamente, se produjo la síntesis de cuatro polipéptidos de masas

moleculares 68.000, 5.800, 3.400 y < 2.000 daltons; teniendo en cuenta que a la izquierda del gen 2 (a la derecha, según se esquematizó en la Figura 10) hay 6 "fases de lectura abierta" con la capacidad de codificar a proteínas de masas moleculares que oscilan entre 10.000 y 3.000 daltons (104), y que todas aquellas deben estar presentes en el fragmento Hind III-B clonado, las que realmente codifiquen a alguna proteína deberían ser expresadas después de la inducción térmica. El tamaño de los polipéptidos de 5.800 y 3.400 daltons, cuya síntesis fué dirigida por el plásmido pLBw2, está de acuerdo con las "fases de lectura abierta" 4 ó 5 y 1 ó 2 respectivamente (104), mientras que el tamaño del polipéptido < 2.000 daltons es demasiado pequeño y no corresponde a ninguna de las "fases de lectura abierta" que están presentes en esa región del genoma de $\phi 29$. Teniendo en cuenta que la infección restrictiva de B. subtilis con el mutante sus1(629) de $\phi 29$ no produce dos proteínas de masas moleculares cercanas a 8.000 y a 4.000 daltons (121,62), es probable que uno de estos dos polipéptidos sea el producto del gen 1, que debería corresponder a una de las dos proteínas de 5.800 y 3.400 daltons, sintetizadas después de inducción térmica de E. coli transformada con el plásmido recombinante pLBw2.

Por otra parte, aunque la proteína de 68.000 daltons tiene el tamaño esperado para la proteína p2

(103), la evidencia de que era realmente p2 se obtuvo de los experimentos en los que se demostró que extractos de E. coli transformada con el plásmido recombinante pLBw2, podían proporcionar proteína p2 funcional en la formación "in vitro" del complejo de iniciación p3-dAMP cuando eran complementados con extractos de B. subtilis infectada con un mutante de $\phi 29$ sin sentido (sus) en el cistrón 2. Además, la proteína p2 presente en los extractos de E. coli transformada con el plásmido pLBw2 pudo ser complementada en la reacción de iniciación "in vitro", no solamente por los extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus 2 de $\phi 29$, sino que también, e incluso con mayor eficiencia, con extractos de E. coli transformada con los plásmidos recombinantes pKC30 A1 (conteniendo las proteínas virales p3, p4 y p5) ó pKC30 A12 (conteniendo las proteínas virales p3 y p4), o incluso con proteína p3 purificada. Estos resultados indicaban que, además de las proteínas p2 y p3, las únicas proteínas virales que podían ser requeridas para la reacción de iniciación eran las proteínas de bajo peso molecular, codificadas a la izquierda del gen 2, entre ellas la proteína p1.

El hecho de que la proteína p2 expresada en E. coli tenía el tamaño esperado (68.000 daltons), representaba un 2% de la proteína sintetizada "de novo" y era activa en la reacción de iniciación "in vitro", nos permitió utilizar estas células de E. coli transformada

con el plásmido recombinante, conteniendo el gen 2, pLBw2, como punto de partida para la purificación de proteína p2 biológicamente activa.

Pensando en la posibilidad de que la proteína p2 fuese la responsable del fuerte requerimiento de ATP en la formación "in vitro" del complejo p3-dAMP, manifestado cuando se utilizaban extractos crudos (ver Resultados (1.4)), elegimos un tipo de cromatografía de afinidad que retiene específicamente enzimas que requieren nucleótidos (122). Este tipo de cromatografía, en columnas de Azul-Dextrano, se basa en el parecido estructural entre las especies nucleotídicas y el grupo cromóforo (Cibacrón Blue F3GA) del colorante Azul-Dextrano.

Los enzimas nucleótido-dependientes, fijados fuertemente a la columna en presencia de iones Mg^{2+} , son posteriormente eluidos disminuyendo la concentración de estos iones y adicionando una alta concentración de nucleótido competidor.

En un principio, la detección de la proteína p2 a lo largo de la purificación se basaba en el conocimiento de su peso molecular (68.000 daltons) y en el ensayo "in vitro" de formación del complejo p3-dAMP, que según se vió en Resultados (1.1), era absolutamente dependiente de la presencia de proteína p2.

Como se mostró en Resultados (3.1), la columna de Azul-Dextrano agarosa (AD-agarosa) resultó muy efectiva, puesto que la proteína p2, presente en los extractos de E. coli transformada con el plásmido pLBw2 que fueron pasados a través de aquella, fué retenida tan fuertemente que sólo pudo ser eluída aumentando la fuerza iónica con ClNa 0.5 M.

Gracias al fraccionamiento obtenido con esta columna se pudo observar una clara relación entre la presencia de una banda de 68.000 daltons en la fracción eluída con ClNa 0.5 M, y la actividad de iniciación "in vitro" (ensayada por complementación con extractos de E. coli transformada con el plásmido pKC30 A1, conteniendo el gen 3 de ϕ 29, en las condiciones indicadas en Métodos (20.2)), que también estaba presente en la misma fracción eluída con ClNa 0.5 M. Esta banda de proteína de 68.000 daltons, así como la actividad de iniciación "in vitro", no estaban presentes en ninguna de las fracciones obtenidas por cromatografía en AD-agarosa de extractos de E. coli transformada con el plásmido control pPLc28 (no conteniendo el gen 2).

Por otra parte, durante el proceso de purificación del precursor de la proteína pre-terminal de adenovirus se había observado la fuerte asociación entre esta proteína y una actividad DNA polimerasa (123), no considerándose en ese momento si esa actividad DNA

polimerasa se requería para la reacción de iniciación que, en el caso de adenovirus, ocurre entre el precursor de la proteína terminal y 5'-dCMP.

Para estudiar esta posibilidad para el caso del bacteriófago $\phi 29$, y, teniendo en cuenta la similitud en el mecanismo de replicación de ambos virus, se examinó la presencia de actividad DNA polimerasa asociada a las proteínas p3 y p2 virales, puesto que ambas son requeridas en la formación del complejo de iniciación p3-dAMP.

La proteína p3 ha sido purificada a partir de extractos de E. coli transformada con el plásmido recombinante pKC30 A1, conteniendo el gen 3 de $\phi 29$, por un procedimiento que incluye cromatografía en DEAE-celulosa, precipitación con polietilenimina y cromatografía en fosfocelulosa (97). En este caso, la proteína p3 obtenida, altamente purificada y activa en la formación del complejo de iniciación cuando fué complementada con extractos de B. subtilis infectada con el mutante sus 3 de $\phi 29$ (97), no presentó asociada ninguna actividad DNA polimerasa (97).

Si bien los intentos para detectar, utilizando DNA activado como molde, una actividad DNA polimerasa específica en los extractos crudos de E. coli conteniendo proteína p2 fracasaron (debido probablemente a la presencia de una alta actividad basal debida a las polimerasas celulares), cuando se ensayó la actividad DNA

polimerasa en las diferentes fracciones obtenidas por cromatografía en AD-agarosa, se observó la existencia de una actividad DNA polimerasa específica (ausente en las fracciones control correspondientes) que, al igual que la actividad de iniciación y la banda de proteína de 68.000 daltons, correspondía a la fracción eluída con ClNa 0.5 M.

Esta actividad DNA polimerasa específica, presente en la fracción eluída con ClNa 0.5 M de la columna de AD-agarosa, fué especialmente activa cuando se utilizó el molde "primer" sintético poli(dA)(dT)₁₂₋₁₈. Una preferencia similar había sido descrita para la actividad DNA polimerasa inducida por el virus de Epstein-Barr(124), por el virus de la varicela (125) y por el Citomegalovirus humano (126).

Por tanto, el hecho de que la fracción eluída con ClNa 0.5 M de la columna de AD-agarosa correspondiente únicamente a los extractos de E. coli transformada con el plásmido pLBw2, que contenía una proteína con el peso molecular esperado para la proteína p2 y era activa en la reacción de iniciación "in vitro", tuviera además actividad DNA polimerasa, sugería fuertemente que esta actividad era intrínseca de la proteína p2. Para demostrar esto, utilizamos una técnica de detección enzimática en geles con SDS, que había sido empleada con éxito para diversos enzimas (127), incluyendo DNA polimerasas (128). Esta reciente técnica, aplicable

a muestras no purificadas, permite conocer el número y peso molecular de las especies activas catalíticamente.

Mediante este análisis "in situ" de actividad, y tal como se describió en Resultados (3.2), se demostró que la actividad DNA polimerasa presente en la fracción 0.5 M de la columna de AD-agarosa correspondía a una proteína de peso molecular 68.000 daltons, que es el peso molecular esperado para la proteína p2 (103).

Por tanto, y teniendo en cuenta esta nueva actividad (DNA polimerasa) asociada a la proteína p2, se modificó el método de purificación eliminando, a nivel de extractos, y tal como se describe en Resultados (3.3) la mayoría de las actividades DNA polimerasa II y III de E. coli . En estas condiciones, la fracción eluída con ClNa 0.7 M de la columna de AD-agarosa, se sometió a cromatografía en fosfocelulosa, obteniéndose, con este paso, proteína p2 con un grado de pureza de aproximadamente el 86%. La proteína p2, así obtenida, poseía actividad de iniciación "in vitro" y actividad DNA polimerasa.

Cabe destacar la eficacia de la purificación, utilizando, tal como se describe en la Tabla de Resultados (3.3), la combinación de 3 criterios de purificación muy diferentes.

Debido a que la "fase de lectura abierta" nº 7 (104), correspondiente a la secuencia del DNA de

Ø29 clonada en el plásmido pLBw2, la única viral con capacidad codificadora para una proteína de 66.500 daltons (104), es responsable de la expresión, en E. coli transformada con este plásmido, de una proteína de 68.000 daltons que fué activa en la reacción de iniciación "in vitro" al complementar extractos de B. subtilis infectada con un mutante sus 2 de Ø29, y que posee intrínsecamente asociada una actividad DNA polimerasa, podemos concluir que esta región del DNA de Ø29 constituye el gen estructural de la DNA polimerasa, p2.

Por otra parte, teniendo en cuenta la naturaleza de la proteína p2 como una DNA polimerasa y su requerimiento en la reacción de iniciación "in vitro", el cuál está de acuerdo con el papel "in vivo" de esta proteína en la iniciación de la replicación del DNA de Ø29 (72), parece que la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 sería la responsable de catalizar la formación del enlace fosfoéster entre la proteína p3 y 5'-dAMP.

Stillman y colaboradores (129) y Friefeld y colaboradores (130) han demostrado la existencia en adenovirus de una DNA polimerasa de 140.000 daltons de peso molecular, que forma un complejo muy estable con la proteína pre-terminal, siendo ambas codificadas por el genoma viral. Esta proteína, al igual que la proteína p2 para el caso de Ø29, es necesaria para la formación

del complejo de iniciación entre la proteína pre-terminal de adenovirus y 5'-dCMP (131).

Resulta interesante el hecho de que los genes correspondientes a ambas DNA polimerasas (el enzima codificado por adenovirus y la proteína p2 de Ø29), están localizadas justo a continuación, y en la dirección de transcripción temprana, de aquellos genes correspondientes a las proteínas pre-terminal de adenovirus y proteína terminal (p3) de Ø29, respectivamente, en el mapa genético de ambos virus. Este hecho puede indicar simplemente una relación evolutiva ó, más probablemente, responder a una necesidad funcional.

Hasta aquí hemos visto que la proteína p2 purificada, caracterizada como una DNA polimerasa, es capaz de formar el complejo de iniciación p3-dAMP cuando es complementada, en presencia de complejo p3-DNA de Ø29 como molde, con extractos crudos de E. coli conteniendo proteína p3. Por tanto, la siguiente cuestión que nos planteamos fué si era necesaria alguna de las proteínas, además de la p2 y p3, presentes en el extracto crudo utilizado o bien únicamente éstas serían capaces de catalizar la reacción de iniciación. Esta posibilidad pudo ser ensayada debido a la disponibilidad de proteínas p2 y p3 purificadas.

Si bien en un principio la formación del complejo p3-dAMP, en presencia de las proteínas p2 y p3 purificadas, fué muy ineficiente, cuando el ensayo se

realizó en presencia de iones NH_4^+ se detectó un alto nivel de actividad, lo cual demuestra que la reacción de iniciación "in vitro" requiere únicamente la presencia de estas dos proteínas virales. Estos resultados indican que la proteína p2 es el enzima que cataliza la formación del enlace covalente entre la proteína terminal p3, y el primer nucleótido (5'-dATP) de la cadena de DNA naciente.

Con objeto de estudiar la implicación de otras proteínas, virales o celulares, en la reacción de iniciación, las proteínas p3 y p2 fueron complementadas con extractos de B. subtilis no infectada ó infectada con un doble mutante sus 2 sus 3 de Ø29. En ambos casos se observó una fuerte estimulación en la formación del complejo p3-dAMP, tanto en presencia como en ausencia de iones NH_4^+ , lo cual sugería la implicación de algún factor(es) celular en esta reacción. Esta actividad estimuladora fué sensible a tratamiento con proteasas lo cual indica que el factor(es) celular posee naturaleza proteica.

Cuando, en presencia de proteínas p2 y p3 purificadas y complejo p3-DNA de Ø29, se ensayaron extractos de E. coli como dadores del factor(es) celular, se observó un nivel de estimulación en la formación del complejo p3-dAMP similar al obtenido con extractos de B. subtilis no infectada. Este hecho sugiere, teniendo en cuenta su posible implicación en la replicación del

DNA de $\phi 29$, que el factor(es) celular debe ser una proteína(s) implicada en un proceso general de la replicación del DNA bacteriano. En este sentido es interesante destacar que la iniciación de la replicación del DNA de adenovirus, que ocurre por un mecanismo similar al de $\phi 29$, requiere únicamente la presencia del precursor de la proteína terminal (pTP) y de una DNA polimerasa específica (Ad-pol) (132,133), siendo ambos productos codificados por el genoma viral. Paralelamente al caso de $\phi 29$, la formación del complejo de iniciación pTP-dCMP de adenovirus es fuertemente estimulada por un factor celular (Factor nuclear I) (132), que en este caso debe corresponder a la maquinaria de replicación eucariótica. Además, se ha demostrado que el Factor nuclear I es una proteína de 47.000 daltons (132), que presenta una gran afinidad por la secuencia terminal entre los nucleótidos 17 y 48, de ambos extremos del DNA viral; esta secuencia contiene 4 regiones muy conservadas en una amplia gama de serotipos de adenovirus humanos (134,135). El mecanismo de acción que se ha postulado para el Factor nuclear I de adenovirus, que podría ser similar al del factor(es) celular descrito en $\phi 29$, se basa en la interacción con esta secuencia específica terminal de forma que se produzca y/o se establezca la apertura de las cadenas de DNA, al nivel de los extremos, necesaria para que se forme el enlace

entre la proteína terminal y el primer nucleótido naciente, que a su vez ha de aparearse con su complementario en el extremo 3' (134). Este modo de acción está apoyado fuertemente por el hecho de que, utilizando como molde DNA de adenovirus, de banda sencilla, la formación del complejo pTP-dCMP (detectable en presencia de Ad-pol y pTP) no fué estimulada por la adición del Factor nuclear I de adenovirus (134).

Si en el caso de Ø29 el factor(es) celular es una proteína implicada en la replicación del DNA celular, el hecho de que esté presente en E. coli puede ser útil para aclarar su función en la iniciación de la replicación del DNA viral, debido al extenso conocimiento de las funciones de las proteínas implicadas en la replicación de esta bacteria, así como a la disponibilidad de mutantes.

Si bien los datos obtenidos, utilizando diferentes mutantes implicados en la síntesis de DNA, no fueron demasiado concluyentes en cuanto a la implicación de los genes 5 y 17 virales en la formación "in vitro" del complejo p3-dAMP, el hecho de que extractos de B. subtilis infectada con un doble mutante sus 2 sus 3 de Ø29 produjese un nivel de estimulación similar al obtenido con extractos no infectados, sugería la no implicación de otros genes virales, aparte de los genes 2 y 3, en esta reacción. Sin embargo, cuando las proteínas

p2 y p3 fueron complementadas con la proteína p6 (viral) purificada, se produjo una estimulación de la formación del complejo p3-dAMP similar a la obtenida cuando se utilizó una fracción dadora del factor(es) celular (136). Por lo tanto, aunque la proteína p6 parecía no estar implicada en un proceso de iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$, según datos obtenidos "in vitro" (Resultados (1.2)), no se puede excluir la posibilidad de que, en ambos casos alguna proteína celular pueda sustituir a la proteína p6 durante la iniciación. Estos datos, obtenidos recientemente, nos plantearon la incógnita de si el factor(es) celular detectado "in vitro" está supliendo a la proteína p6 ó si ambas proteínas desempeñan funciones diferentes durante la formación del complejo p3-dAMP.

En adenovirus, la reacción de formación del complejo pTP-dCMP es estimulada por una tercera proteína viral además de la pTP y la Ad-pol (132). Esta nueva proteína, caracterizada como una proteína de unión a DNA de banda simple (Ad-DBP), sólo produce estimulación cuando se ensaya en presencia del Factor nuclear I (132), lo cual sugiere que sus funciones en la formación del complejo de iniciación son diferentes. Además de este papel en la iniciación "in vitro", la Ad-DBP está implicada en la elongación del DNA de adenovirus (137).

La proteína p6 de $\phi 29$ se asemeja fuertemente a la Ad-DBP en su afinidad por DNA de cadena sencilla así como en su implicación en la elongación del DNA, demostrada por experimentos "in vivo" (72). Por tanto, y teniendo en cuenta la similitud de ambos mecanismos de replicación es probable que la proteína p6 y el factor(es) celular implicado en la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$, realicen funciones diferentes en esta reacción.

Otra cuestión a resolver era qué DNA polimerasa (viral ó celular) se encargaba de la elongación del complejo de iniciación p3-dAMP. Los genes 5, 6 y 17 de $\phi 29$, según estudios realizados "in vivo" (72) e "in vitro", parecen estar implicados en un paso de elongación en la replicación del DNA viral, por lo que alguno de ellos podría ser candidato, además de las DNA polimerasas celulares, para encargarse de la elongación del complejo de iniciación. Por otra parte, y debido a la naturaleza de la proteína p2 como una DNA polimerasa, cabía pensar que tuviese, además de su papel en la iniciación, un papel en la elongación del DNA de $\phi 29$. En efecto, la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 fué capaz de elongar específicamente el complejo p3-dAMP formado en la reacción de iniciación, dando lugar a moléculas completas de DNA de nueva síntesis. Esta síntesis "in vitro" de DNA catalizada por la actividad DNA polimerasa de

la proteína p2 requiere únicamente la presencia de proteína terminal libre (p3), necesaria para la reacción de iniciación, y el molde de DNA de $\phi 29$ unido covalentemente a la proteína p3 paterna. Por otra parte, los resultados obtenidos indican que la replicación "in vitro" de este complejo p3-DNA de $\phi 29$ comienza en ambos extremos del DNA (formación del complejo p3-dAMP), progresando, en cada caso, hacia el extremo opuesto, hasta dar lugar a la síntesis de moléculas completas de DNA de $\phi 29$. Estos resultados, obtenidos utilizando un sistema "in vitro" de replicación, confirman el modelo propuesto e indican que la proteína p2 podría ser la única DNA polimerasa implicada en la replicación del DNA de $\phi 29$.

En este sentido, el hecho de que experimentos "in vivo" utilizando el mutante ts2(98) indicaran que la mutación afectaba a un paso de iniciación en la replicación del DNA de $\phi 29$ (72), si bien se ajusta al papel de la proteína p2 en la formación del complejo p3-dAMP, resulta contradictoria con su actividad en la elongación del DNA viral. Sin embargo, los resultados obtenidos "in vivo" podrían explicarse suponiendo que la proteína p2 tiene 2 centros activos, uno para iniciación y otro para elongación, y que la mutación ts2(98) afecta al primero de ellos, o bien que la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 esté protegida de la inac-

tivación térmica cuando ya está formando parte del complejo de replicación. Un resultado "in vivo" similar al del mutante ts2(98) de Ø29 ha sido descrito para el mutante ts149 de adenovirus tipo 5 (138), el cuál está afectado en el gen de la DNA polimerasa viral.

El factor(es) celular estimulador de la formación del complejo de iniciación p3-dAMP no afectó esencialmente al nivel de elongación obtenido en presencia de las proteínas p2 y p3 purificadas, puesto que la estimulación observada en el marcaje de los fragmentos terminales, se debe probablemente a un efecto indirecto de su actividad en la iniciación. En adenovirus, el Factor nuclear I, estimulador de la formación del complejo pTP-dCMP, tampoco parece intervenir en la posterior elongación del mismo (139). Es interesante, por tanto, resaltar el hecho de que solamente 2 proteínas virales, la DNA polimerasa (p2) y la proteína terminal (p3), puedan replicar el complejo p3-DNA de Ø29. La replicación del DNA de adenovirus requiere 3 proteínas virales (el precursor de la proteína terminal (pTP), la DNA polimerasa (Ad-pol) y una proteína de unión a DNA de banda sencilla (Ad-DBP)) y 2 factores celulares (Factores nucleares I y II) para obtener la síntesis "in vitro" de moléculas de DNA completas (139), si bien el enzima viral es la única DNA polimerasa necesaria para ello. En ausencia del Factor nuclear I, que se

sabe que contiene una actividad del tipo topoisomerasa I, el producto sintetizado alcanzó solamente el 25% del tamaño del DNA de adenovirus completo (139). Una posible explicación de la necesidad de una actividad topoisomerasa tipo I para obtener DNA de longitud unidad en el caso de la replicación "in vitro" de adenovirus y no en el de Ø29, podría ser el hecho de que la longitud del DNA de éste es aproximadamente el doble de la del DNA de Ø29.

Del experimento de "pulso y caza" mostrado en la Figura 26, realizado con p2 y p3 como únicas proteínas además de la proteína p3 paterna unida al DNA de Ø29, se puede calcular un valor para la velocidad de elongación de, aproximadamente, 10 nucleótidos/segundo a 30°C. Este valor es similar al obtenido para la replicación del DNA de adenovirus utilizando las 5 proteínas indicadas anteriormente (139); este valor obtenido "in vitro" fué similar al obtenido "in vivo" y al correspondiente a la replicación del DNA de adenovirus en la célula huésped (139). En el caso de Ø29 no se dispone de datos sobre la velocidad de elongación del DNA "in vivo", pero teniendo en cuenta que la velocidad de desplazamiento de la horquilla de replicación en el cromosoma de E. coli es aproximadamente 1.000 nucleótidos/segundo (2), parece probable que la velocidad obtenida "in vitro" sea lenta y, por tanto, sea necesaria la colaboración

de otras proteínas para aumentar la velocidad de elongación. Además de otros posibles factores celulares, las proteínas virales p5, p6 y p17, implicadas en la síntesis del DNA "in vivo" (107), podrían ser candidatas para estimular la velocidad de elongación del DNA de $\phi 29$ observadas "in vitro" y catalizada por la proteína p2, puesto que experimentos "in vivo" han implicado a las proteínas p5 y p6 en pasos de elongación o maduración (72) y los resultados obtenidos "in vitro" con el mutante sus17(741) de $\phi 29$ también sugieren, aunque indirectamente, que la proteína p17 podría estar implicada en la elongación del DNA. Es muy probable que la proteína p6, además del papel en la iniciación descrito anteriormente, intervenga en la elongación del DNA de $\phi 29$ debido a su naturaleza de proteína con afinidad por DNA de banda sencilla, la cual le permitiría estabilizar la banda desplazada por el avance de la horquilla de replicación.

Muchos sistemas "in vitro" de replicación de DNA derivados de organismos procarióticos requieren altas concentraciones de ATP; esto suele ser debido a que muchos de los enzimas de replicación requieren la energía que les proporciona la hidrólisis del ATP para realizar sus actividades catalíticas. En otros casos, el ATP puede ejercer su función provocando cambios alostéricos en la conformación de las proteínas implicadas en la replicación ó bien por fosforilación de

las mismas. Los resultados obtenidos utilizando un sistema "in vitro" de replicación del complejo p3-DNA de Ø29, que contiene únicamente las proteínas virales p2 (DNA polimerasa) y p3 (proteína terminal), indican que las reacciones de iniciación y elongación son totalmente independientes de la presencia de ATP, siendo, en algunas ocasiones, incluso inhibitoria (Resultados (4.6.1)). En el caso de adenovirus, la replicación completa del DNA en presencia de las 5 proteínas descritas anteriormente, requiere, para su máxima actividad, la presencia de ATP (139).

De todas formas, no se puede descartar la posibilidad de que la hidrólisis de los dNTPs, que tiene lugar durante la polimerización, pueda proporcionar energía suficiente para la replicación "in vitro" del DNA de Ø29. Estos resultados de independencia del ATP obtenidos con el sistema "in vitro" purificado descrito anteriormente, contrastan con otros obtenidos previamente, utilizando sistemas crudos o parcialmente purificados, que indicaban un fuerte requerimiento por ATP en la reacción de iniciación "in vitro". Una posible explicación puede ser que cuando se utilizan sistemas crudos, la presencia de ATP (1 mM) impide la degradación de los dNTPs; hay que tener en cuenta que la concentración de dATP utilizada en el ensayo de iniciación es solamente 0.25 μ M. Esta explicación ha sido sugerida y en cierto modo demostrada para el

caso de la replicación "in vitro" del DNA de adenovirus (120). También está de acuerdo con esta hipótesis el hecho de que la reacción de iniciación "in vitro", utilizando un sistema crudo, fuera estimulada por otros deoxi- o ribonucleósidos trifosfato (Ver Resultados (1.4)).

Por otra parte, la replicación del complejo p3-DNA de $\emptyset 29$, utilizando el sistema purificado, fué estimulada fuertemente por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, debiéndose esta estimulación global a un incremento en la cantidad de complejo de iniciación p3-dAMP formado. Cuando se utilizaron otras sales como sustitutas del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, se observó un efecto similar con el ClNH_4 y el ClK , pero no se observó efecto alguno con el ClNa , lo que sugiere que el efecto estimulador de la reacción de iniciación debe ser específico de los iones NH_4^+ y K^+ . No se observó efecto apreciable del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en la reacción de elongación ni con el complejo p3-DNA de $\emptyset 29$, ni utilizando DNA activado como molde, lo cual sugiere que la estimulación producida por el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ no es sobre la actividad DNA polimerasa de la proteína p2.

En nuestro laboratorio se ha detectado recientemente la formación de un complejo entre la proteína terminal (p3) y la DNA polimerasa de $\emptyset 29$ (p2). Esta asociación también se había observado para las proteínas homólogas de adenovirus, sugiriéndose un

significado funcional debido a la estequiometría equimolar observada "in vivo" (123). En el caso de adenovirus, el complejo pTP-(Ad-pol) parece colocarse en el lugar adecuado para la formación del enlace entre la pTP y 5'-dCMP no sólo por interacción con la proteína terminal (TP), sino también reconociendo una región del DNA entre los nucleótidos 9 y 22 a partir de ambos extremos (140). Si bien en adenovirus no se ha descrito ningún efecto similar, una posibilidad que explique el efecto del sulfato amónico sobre la iniciación de la replicación del DNA de Ø29, podría ser favoreciendo la interacción de las proteínas p2 y p3 para formar el complejo p2-p3 ó bien favoreciendo la interacción de este complejo con una posible secuencia de reconocimiento (posiblemente la repetición terminal invertida) en ambos extremos del DNA.

La Aphidicolina es un diterpenoide tetracíclico que interfiere con la actividad de algunas DNA polimerasas implicadas en la replicación (141-146), siendo su mecanismo de inhibición generalmente competitivo con uno de los dNTPs y no competitivo con el resto (145). Esta droga es un inhibidor específico de la DNA polimerasa α eucariótica, debido a lo cual ha sido muy útil para asignar un papel de este enzima en varios procesos de replicación (147). Así, por ejemplo, la replicación de DNA nuclear y la replicación del DNA del virus SV40

son altamente sensibles a esta droga (148), mientras que la síntesis de DNA mitocondrial es completamente insensible (149). La replicación del DNA de adenovirus también es sensible a Aphidicolina, pero a mucha mayor concentración que la que inhibe a la DNA polimerasa α (123,150-153). Algunos autores han explicado la diferencia de nivel inhibitor sugiriendo que este enzima (DNA polimerasa α) interviene en la replicación del DNA de adenovirus, pero en una forma más resistente a la droga producida por interacción con otras proteínas de replicación (154). Por otra parte, aunque Enomoto y col. (123) han demostrado la implicación de una DNA polimerasa viral en la replicación de adenovirus, el hecho de que, "in vitro", su actividad no sea inhibida por esta droga (123,131) origina que se siga pensando en un papel de la DNA polimerasa α en la replicación del DNA viral. Además, cuando se ensayó el efecto de la Aphidicolina sobre un sistema "in vitro" de replicación del DNA de adenovirus se observó que la droga inhibía la elongación de la cadena de DNA, pero no la reacción de iniciación (formación del complejo pTP-dCMP) (69). Otros autores han demostrado que la elongación de la cadena del DNA de adenovirus desde ambos extremos 5' hasta el 30%, aproximadamente, de la longitud del genoma viral no es inhibida por Aphidicolina, mientras que la síntesis de fragmentos interiores fué inhibida

fuertemente; por tanto, han sugerido que la DNA polimerasa α está implicada en la elongación del DNA en una región localizada a 12 Kb de cada extremo, mientras que otro enzima (probablemente la DNA polimerasa viral), insensible a Aphidicolina, estaría implicado en la iniciación y elongación de las otras regiones del DNA viral (21).

En resumen, mientras que algunos autores defienden la implicación de la DNA polimerasa α eucariótica en la replicación de adenovirus, basándose en el efecto inhibidor de la Aphidicolina, otros (69) se muestran claramente escépticos, considerando : 1) la gran diferencia entre las concentraciones inhibitorias que se precisan para la replicación del DNA celular respecto a la del DNA viral; 2) las diferencias en el mecanismo de inhibición en los casos anteriores : competitiva por dCTP en el caso de la DNA polimerasa (153,156) y competitiva por dTTP para el caso de la replicación "in vitro" del DNA de adenovirus (153); 3) en otros casos como el del virus Herpes simplex (148,154) o como el del virus de la Vacuna (157), los cuales codifican polimerasas virales, se ha demostrado un efecto inhibidor de la Aphidicolina sobre estos enzimas a concentraciones diferentes de las requeridas para la DNA polimerasa α .

Por otra parte, y para aumentar la controversia existente, el hecho de que la Aphidicolina inhiba también la replicación de los bacteriófagos Ø29 y M2 (109), relacionados claramente con adenovirus en lo que respecta al mecanismo de replicación de sus genomas conteniendo proteínas terminales, ha sugerido que la sensibilidad a la droga depende directamente de la presencia de estas proteínas, en lugar de estar relacionada con alguna actividad DNA polimerasa (H. Hirokawa, comunicación personal). Por tanto, la disponibilidad de un sistema "in vitro" de replicación del complejo p3-DNA de Ø29 basado únicamente en la presencia de las proteínas terminal (p3) y DNA polimerasa (p2) virales nos ha permitido un estudio más preciso de la acción de esta droga.

Si bien los resultados obtenidos con nuestro sistema "in vitro" de replicación, en presencia de las proteínas p2 y p3 purificadas, mostraron un efecto inhibitorio de la droga Aphidicolina similar a los obtenidos "in vivo" (109) e "in vitro" (82,110) utilizando sistemas no purificados, el hecho de que la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 (ensayada con DNA activado o con poli(dA)(dT)₁₂₋₁₈ como moldes) mostrase una apreciable sensibilidad a la droga sugirió que el efecto observado en el ensayo de replicación "in vitro" del complejo p3-DNA de Ø29, se debía probablemente a

una inhibición de la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 más que a una acción directa sobre la proteína terminal p3. Cuando se analizó el efecto de la Aphidicolina sobre la actividad exonucleasa 3' → 5' de la proteína p2 se observó una inhibición similar a la obtenida en el ensayo de replicación en presencia de p2 y p3 purificadas. Estos resultados sugieren fuertemente que el efecto de la droga es sobre la DNA polimerasa (p2) en sí misma. También se ha descrito un efecto de la Aphidicolina sobre la actividad exonucleasa 3' → 5' asociada a la DNA polimerasa inducida por el virus Herpes simplex (158), así como sobre la actividad nucleasa asociada a la DNA polimerasa δ de mamíferos (159).

La droga BuAdATP, también inhibidora de la DNA polimerasa α eucariótica (N. Brown y G. Wright, comunicación personal), mostró un efecto muy similar a la Aphidicolina sobre la actividad de replicación "in vitro" así como sobre las actividades DNA polimerasa y exonucleasa 3' → 5' de la proteína p2.

Hasta aquí hemos visto que la proteína p2 es una DNA polimerasa viral que interviene en la replicación del DNA de $\phi 29$ actuando en dos etapas bien diferenciadas :

1) INICIACION, en la que cataliza la deoxi-adenilación de la proteína terminal p3 respetando las reglas de complementariedad de bases de Watson y Crick,

formando un complejo covalente p3-dAMP.

2) ELONGACION, en la que actúa como una DNA polimerasa clásica, incorporando progresivamente deoxi-nucleótidos a la cadena en crecimiento a partir del complejo p3-dAMP, hasta replicar la totalidad del genoma.

Por lo tanto, parece ser la única DNA polimerasa que interviene en la replicación del DNA de Ø29 "in vitro". Este enzima especial, tiene asociada una actividad exonucleolítica que degrada DNA de cadena sencilla en dirección $3' \rightarrow 5'$, liberando deoximono-nucleótidos. La actividad exonucleasa de la proteína p2 puede utilizar como sustrato DNA de cadena sencilla marcado en el extremo $3'$ con deoxi-ATP ó con di-deoxi-ATP, indicando que el enzima no es muy específico para la configuración "deoxirribo", a diferencia de la actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ de la DNA polimerasa I de E. coli (2).

Dos criterios han demostrado que esta actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ estaba realmente asociada a la DNA polimerasa codificada por el gen 2 de Ø29 :

1º) Ambas actividades fueron inactivadas por calor con idénticas cinéticas.

2º) Las dos actividades presentes en la fracción de proteína p2 purificada cosedimentaron en un gradiente de glicerol en una posición correspondiente al peso molecular de la DNA polimerasa nativa (68.000 daltons). Además, y de acuerdo con el requerimiento de

la DNA polimerasa durante la iniciación de la replicación del DNA de Ø29, la capacidad de catalizar la formación del complejo p3-dAMP (actividad de iniciación), también cosedimentó en el gradiente de glicerol con las actividades de replicación y exonucleasa 3' → 5' de la proteína p2.

Al igual que otras exonucleasas 3' → 5' asociadas a DNA polimerasas, la actividad presente en la DNA polimerasa codificada por Ø29 requiere Mg^{++} y es inhibida por altas concentraciones de sal.

La presencia de deoxinucleósidos-5'-trifosfato no afectó esencialmente la actividad exonucleasa 3' → 5' de la DNA polimerasa de Ø29 al igual que ha sido descrito para la actividad exonucleasa 3' → 5' sobre DNA de banda sencilla de la DNA polimerasa I de E. coli (2) y en contraste con la inhibición por deoxirribonucleósidos -5'-trifosfato de la actividad exonucleasa 3' → 5' sobre DNA de banda sencilla de la DNA polimerasa del bacteriófago T7 (112,160). La presencia de ribonucleósidos-5'-trifosfato o la de nucleósidos-5'-monofosfato en la configuración "deoxi" o "ribo" no afectó la actividad exonucleasa 3' → 5' de la proteína p2.

La actividad exonucleásica 3' → 5' de la DNA polimerasa de Ø29 es muy específica para DNA de cadena sencilla al igual que las correspondientes

actividades de las DNA polimerasas I y III de E. coli (2) y de la DNA polimerasa de T4 (161).

Para entender el papel biológico de esta actividad exonucleolítica asociada a la DNA polimerasa de $\phi 29$ conviene revisar una serie de datos. El índice de mutación espontánea en microorganismos (10^{-6} - 10^{-8}) sugiere la existencia de un alto grado de fidelidad durante la replicación. El grado de error estimado "in vitro" con la DNA polimerasa I de E. coli (5,163) y con la DNA polimerasa de T4 (163) es de 1 en (10^5 - 10^6) pares de bases. Sin embargo la ΔG de discriminación entre pares de bases de Watson y Crick como "correctos" o "incorrectos" no proporciona una fidelidad en la replicación que vaya más allá de 1 error en (10^2 - 10^3) pares de bases (3). Por tanto, el incremento en fidelidad de estas DNA polimerasas al copiar moldes de DNA "in vivo" o "in vitro" se ha adscrito en parte a la actividad exonucleasa 3' \longrightarrow 5' asociada a estas DNA polimerasas (4), en cuanto que ejerce una función de "corrección de pruebas" que elimina los nucleótidos mal incorporados en el extremo de la cadena de DNA en crecimiento, previamente a que ocurra un posterior paso de polimerización. La importancia de la actividad exonucleasa en mantener la fidelidad de la replicación se ha resaltado en buena medida gracias a estudios realizados con el bacteriófago T4. Mutaciones en el gen

estructural para la DNA polimerasa de T4 originaban estirpes con un índice de mutación espontánea aumentado (mutadoras) (164), o bien disminuido (antimutadoras) (165); cuando se examinó la relación entre las actividades DNA polimerasa y exonucleasa de los enzimas parcialmente purificados de estos mutantes, se observó que las estirpes "mutadoras" tenían una relación nucleasa : polimerasa inferior al tipo salvaje, mientras que las estirpes "antimutadoras" presentaban esta relación incrementada respecto al tipo salvaje (166).

Por lo tanto, y de acuerdo con su papel en la replicación del DNA de $\phi 29$ es interesante apuntar que la DNA polimerasa de $\phi 29$ posee asociada una actividad exonucleolítica 3' \rightarrow 5' que posiblemente le permita incrementar la fidelidad de replicación. Ahora bien, puesto que la DNA polimerasa de $\phi 29$ es tan esencial para la elongación como para la iniciación, la actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5' asociada podría actuar como un mecanismo "corrector de pruebas" que asegurase también la fidelidad de la iniciación; una posibilidad alternativa, o la incidencia de ambas, sería una estricta especificidad por parte de la proteína terminal en su papel de "primer" respecto al enlace fosfoéster que, en el caso de $\phi 29$, ocurre entre el residuo de serina nº 232 de la proteína terminal p3 y 5'-dAMP (Hermoso, J.M., Soriano, F, Méndez, E. y Salas, M., en preparación).

Al igual que las DNA polimerasas de los bacteriófagos T4, T5 y T7 (167) la DNA polimerasa del bacteriófago ϕ 29 no posee actividad exonucleotídica 5' \rightarrow 3'; permanece sin determinar si ϕ 29 induce una actividad exonucleasa 5' \rightarrow 3' diferente de la DNA polimerasa, como ocurre después de la infección de T5 y T7 (167). Sin embargo, y puesto que la replicación del DNA de ϕ 29 se inicia por un mecanismo de "priming" por proteína, y no parece ser necesaria síntesis discontinua mediada por RNA, es probable que una actividad exonucleasa 5' \rightarrow 3', cuya función suele ser degradar los "primer" de RNA, sea completamente innecesaria.

C O N C L U S I O N

Se ha purificado y caracterizado una nueva DNA polimerasa viral que interviene en la iniciación de la replicación catalizando la formación de un enlace covalente (fosfoéster) entre el grupo hidroxilo de un residuo de serina en la proteína terminal (p3) y 5'-dAMP, actuando como una DNA polimerasa que es capaz de reconocer, además del grupo 3'-OH proporcionado por un nucleótido en la cadena de DNA, el grupo hidroxilo de un residuo de serina en la proteína p3.

Esta DNA polimerasa no actúa solamente durante la iniciación "primada" por la proteína terminal, sino que es capaz de elongar específicamente el complejo de iniciación p3-dAMP hasta sintetizar moléculas de DNA de tamaño unidad. Por tanto parece ser la única DNA polimerasa encargada de la replicación del DNA del bacteriófago ϕ 29.

Además, y en apoyo de su papel en la replicación, esta nueva DNA polimerasa posee una actividad exonucleolítica 3' \rightarrow 5' sobre DNA de cadena sencilla que la capacita para ejercer la función biológica de "corrección de pruebas" que asegure la fidelidad del proceso de replicación. Paralelamente, se ha desarrollado un sistema "in vitro" de replicación del complejo p3-DNA de ϕ 29 que cataliza la formación del complejo de iniciación p3-dAMP (reacción de iniciación), así como su posterior elongación hasta alcanzar la longitud correspondiente a DNA de tamaño unidad. Los resultados

obtenidos con este sistema "in vitro", basado únicamente en la presencia de dos proteínas virales : la proteína terminal (p3), que funciona como "primer" en la iniciación, y la DNA polimerasa (p2), confirman el modelo propuesto para la replicación del DNA de Ø29 (58).

La Figura 38 resume nuestro conocimiento actual del mecanismo de replicación del DNA del bacteriófago Ø29 : una molécula libre de proteína terminal, p3, se colocaría indistintamente en cualquiera de los dos orígenes de replicación mediante interacción con la proteína p3 paterna unida a ambos extremos del DNA y posiblemente reconociendo también la repetición terminal invertida. Una vez allí, actuaría de "primer" uniéndose covalentemente al nucleótido 5' terminal, en una reacción catalizada por la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 y estimulada por iones NH_4^+ y algún factor(es) celular y/o la proteína p6 viral. El complejo de iniciación p3-dAMP así formado, que ya suministra un extremo 3'-OH libre, es elongado por la actividad DNA polimerasa de la proteína p2 hasta alcanzar el extremo opuesto de la molécula, dando lugar a la síntesis de nuevas cadenas de DNA de tamaño unidad. Por lo tanto, se propone que la proteína p2 es la única DNA polimerasa implicada en la replicación del DNA de Ø29.

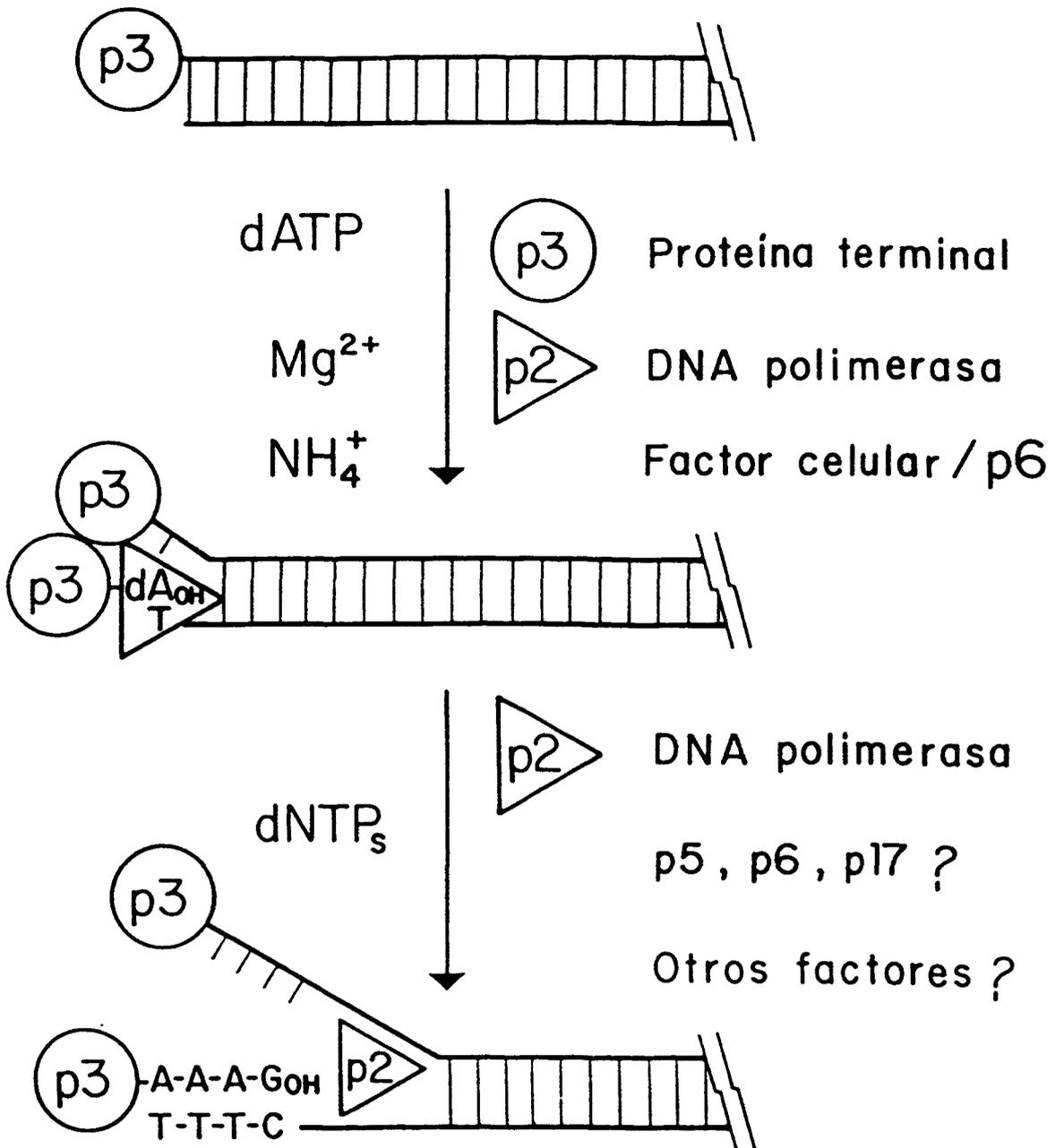


Figura 38. Modelo para la replicación del DNA de $\phi 29$.

Probablemente, otras proteínas virales como la p5, p6 y p17 así como algún posible factor celular intervienen en la replicación del DNA viral mejorando la procesividad de la elongación catalizada por la DNA polimerasa de Ø29.

Por tanto, el sistema empleado por Ø29 para solucionar la iniciación de la síntesis de DNA que permita la replicación de su genoma lineal, se basa en la utilización de una proteína viral que funciona realmente como un "primer" en sí misma, contrastando con otros mecanismos en los que el "primer" ha de ser sintetizado por una actividad enzimática. Directamente a partir de la proteína terminal (p3), y catalizada por una DNA polimerasa viral, se produce la síntesis del primer nucleótido de la cadena de DNA. Las características de este mecanismo posibilitan que este "primer" especial no precise ser degradado posteriormente, ya que incluso seguirá cumpliendo un importante papel en la iniciación de nuevas rondas de replicación.

Este mecanismo de iniciación por una proteína es probable que sea un modelo generalizado de iniciar la replicación en los extremos de DNAs lineales conteniendo proteína terminal, y que una DNA polimerasa específica, capaz de reconocer el grupo hidroxilo de un residuo de aminoácido en la proteína terminal, sea requerida en cada caso.

B I B L I O G R A F I A

1. Watson, J.D. y Crick, F.H.C. (1953). *Nature* 171, 964.
2. Kornberg, A. (1980). En "DNA replication". Freeman, W.H. y Co., eds., San Francisco.
3. Mildvan, A.S. (1974). *Annu. Rev. Biochem.* 43, 357.
4. Brutlag, D. y Kornberg, A. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 241.
5. Springgate, C. y Loeb, L.A. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 245.
6. Bollum, F.J. (1964). *Science* 144, 560.
7. Alberts, B. y Sternglanz, R. (1977). *Nature* 269, 655.
8. Hardt, N., Dinsart, C., Spadari, S., Pedrali-Noy, G. y Rommelaere, J. (1983). *J. Gen. Virol.* 64, 1991.
9. Litvak, S. y Araya, A. (1982). *Trends Biochem. Sci.* 7, 361.
10. Rapaport, E. y Zamecnik, P.C. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3984.
11. Grummt, F., Walzl, G., Jantzen, H.M., Hamprecht, K., Hübscher, U. y Kuenzle, C.C. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6081.
12. Zamecnik, P.C., Rapaport, E. y Baril, E. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1791.

13. Brutlag, D., Schekman, R. y Kornberg, A. (1971).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2826.
14. Schekman, R., Wickner, W., Westergaard, O.,
Brutlag, D., Geider, K., Bertsch, L.L. y Kornberg,
A. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2691.
15. Blair, D.G., Sherratt, D.J., Clewell, D.B y
Helinski, D.R. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci. USA
69, 2518.
16. Williams, P.H., Boyer, H.W. y Helinski, D.R.
(1973). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3744.
17. Sakakibara, Y. y Tomizawa, J. (1974). Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 71, 802.
18. Okazaki, T., Kurosawa, Y., Ogawa, T., Seki, T.,
Shinozaki, K., Hirose, S., Fujiyama, A., Kohara,
Y., Machida, Y., Tamanoi, F. y Hozumi, T. (1978).
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 203.
19. Kurosawa, Y. y Okazaki, T. (1979). J. Mol. Biol.
135, 841.
20. Buckley, P.J., Josturko, L.D. y Kozinski, A.W.
(1972). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3165.
21. Sugino, A., Hirose, S. y Okazaki, R. (1973).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1863.
22. Sugino, A. y Okazaki, R. (1973). Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 70, 88.

23. Sato, S., Ariake, S., Saito, M. y Sugimura, T. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 827.
24. Fox, R.M., Mendelsohn, J., Barbosa, E. y Goulian, M. (1973). *Nature New Biol.* 245, 234.
25. Magnusson, G., Pigiet, V., Winnacker, E.L., Abrams, R. y Reichard, P. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 412.
26. Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Kainuma, R., Sugino, R. y Zawatsuki, N. (1968). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 129.
27. Lewin, B. (1983). En "Genes". John Wiley & Sons. New York.
28. Watson, J.D. (1972). *Nature (London) New Biol.* 239, 197.
29. Bernstein, H. y Bernstein, C. (1973). *J. Mol. Biol.* 77, 335.
30. Weigel, P.H., Englund, P.T., Murray, K. y Old, R.W. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1151.
31. Salas, M. y Viñuela, E. (1980). *Trends in Biochemical Sciences*, Julio, pp. 191.
32. Ortín, J., Viñuela, E., Salas, M. y Vázquez, C. (1971). *Nature (London) New Biol.* 234, 275.

33. Salas, M., Mellado, R.P., Viñuela, E. y Sogo, J.M. (1978). *J. Mol. Biol.* 119, 269.
34. Robinson, A.J., Youngusband, H.B. y Bellet, A.J.D. (1973). *Virology* 56, 54.
35. Gerlich, W.H. y Robinson, W.S. (1980). *Cell* 21, 801.
36. Yoshikawa, H. e Ito, J. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1596.
37. Lee, Y.F., Nomoto, A., Detjen, B.M. y Wimmer, E. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 59.
38. Flanagan, J.B., Peterson, R.F., Ambros, V., Hewlett, M.J. y Baltimore, D. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 961.
39. Golini, F., Nomoto, A. y Wimmer, E. (1978). *Virology* 89, 112.
40. Hruby, D.E. y Roberts, W.K. (1978). *J. Virol.* 25, 413.
41. Sangar, D.V., Rowlands, D.J., Harris, T.J.R. y Brown, F. (1977). *Nature* 268, 648.
42. Burroughs, J.N. y Brown, F. (1978). *J. gen. Virol.* 41, 443.
43. Daubert, S.D., Bruening, G. y Najarian, R.C. (1978). *Eur. J. Biochem.* 92, 45.

44. Harrison, D.D. y Barker, H. (1978). *J. gen. Virol.* 40, 711.
45. Hirochika, H. y Sakaguchi, K. (1982). *Plasmid* 7, 59.
46. Kemble, R.J. y Thompson, R.D. (1982). *Nucleic Acids Res.* 10, 8181.
47. Bamford, D., McGraw, T., Mackenzie, G. y Mindich, L. (1983). *J. Virol.* 47, 311.
48. García, E., Gómez, A., Ronda, C., Escarmís, C. y López, R. (1983). *Virology* 128, 92.
49. Rekosh, D.M.K., Russell, W.C. y Bellet, A.J.D. (1977). *Cell* 11, 283.
50. Carusi, E.A. (1977). *Virology* 76, 390.
51. Brown, D.T., Westpahl, M., Burlingham, B.T., Winterhoff, U., Doerfler, W. (1975). *J. Virol.* 16, 366.
52. Ruben, M., Bacchetti, S. y Graham, F. (1983). *Nature* 301, 172.
53. Hermoso, J.M. y Salas, M. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6425.
54. Desiderio, S.V. y Kelly, T.J.Jr. (1981). *J. Mol. Biol.* 145, 319.

55. Escarmís, C. y Salas, M. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1446.
56. Yoshikawa, H., Friedmann, T. e Ito, J. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1336.
57. Tolun, A., Aleström, P., Pettersson, U. (1979). Cell 17, 705.
58. Inciarte, M.R., Salas, M. y Sogo, J.M. (1980). J. Virol. 34, 187.
59. Harding, N. e Ito, J. (1980). Virology 104, 323.
60. Lechner, R.L. y Kelly, T.J.Jr. (1977). Cell 12, 1007.
61. Sussenbach, J.S. y Kuijk, M.G. (1977). Virology 77, 140.
62. Carrascosa, J.L., Camacho, A., Moreno, F., Jiménez, F., Mellado, R.P., Viñuela, E. y Salas, M. (1976). Eur. J. Biochem. 66, 229.
63. Hagen, E.W., Reilly, B.E., Tosi, M.E. y Anderson, D.L. (1976). J. Virol. 19, 501.
64. Sogo, J.M., García, J.A., Peñalva, M.A. y Salas, M. (1982). Virology 116, 1.
65. Kelly, T.J.Jr. y Lechner, R.L. (1978). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 721.

66. Escarmís, C., Gómez, A., García, E., Ronda, C., López, R. and Salas, M. (1984). *Virology* 133, 166.
67. Peñalva, M.A. y Salas, M. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5522.
68. Lichy, J.H., Horwitz, M.S. y Hurwitz, J. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2678.
69. Pincus, S., Robertson, W. y Rekosh, D. (1981). *Nucleic Acids Res.* 9, 4919.
70. Stillman, B.W., Lewis, J.B., Chow, L.T., Mathews, M.B. y Smart, J.E. (1981). *Cell* 23, 497.
71. Challberg, M.D. y Kelly, T.J.Jr. (1981). *J. Virol.* 38, 272.
72. Mellado, R.P., Peñalva, M.A., Inciarte, M.R. y Salas, M. (1980). *Virology* 104, 84.
73. Moreno, F., Camacho, A., Viñuela, E. y Salas, M. (1974). *Virology* 62, 1
74. Mellado, R.P., Viñuela, E. y Salas, M. (1976). *Eur. J. Biochem.* 65, 213.
75. Gass, K.B. y Cozzarelli, N.R. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 7688.
76. García, J.A., Pastrana, R., Prieto, I. y Salas, M. (1983). *Gene* 21, 65.

77. Reilly, B.E., Zeece, V.M. y Anderson, D.L.
(1973). *J. Virol.* 11, 756.
78. Talavera, A., Jiménez, F., Salas, M. y Viñuela, E.
(1971). *Virology* 46, 586.
79. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.Y.,
Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W.,
Crosa, Y.H. y Falkows, S. (1977). *Gene* 2, 95.
80. Remaut, E., Stanssens, P. y Fiers, W. (1981).
Gene 15, 81.
81. Adams, H.M. (1950). En "Bacteriophages". Inter-
science Publishers, Inc., New York.
82. Watabe, K., Shih, M.F., Sugino, A. e Ito, J.
(1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5245.
83. Clewell, D.B. y Helinsky, D.R. (1970). *Biochemistry*
9, 4428.
84. Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). *Nucleic Acids*
Res. 7, 1513.
85. Jiménez, F., Camacho, A., de la Torre, J., Viñuela,
E. y Salas, M. (1977). *Eur. J. Biochem.* 73, 57.
86. Inciarte, M.R., Lázaro, J.M., Salas, M. y Viñuela, E.
(1976). *Virology* 74, 314.
87. Schleif, R.F. y Wensink, P.C. (1981). En "Practical
Methods in Molecular Biology". Springer, New York,
pp. 138.

88. Carrascosa, J.L., Viñuela, E., García, N. y Santisteban, A. (1982). *J. Mol. Biol.* 154, 311.
89. Murray, N.E., Bruce, S.A. y Murray, K. (1979). *J. Mol. Biol.* 132, 493.
90. Lederberg, E.M. y Cohen, S.N. (1979). *J. Bacteriol.* 119, 1072.
91. Grunstein, M. y Hogness, D.S. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961.
92. Fairbanks, G., Steck, T.L. y Wallach, D.F.H. (1971). *Biochemistry* 10, 2606.
93. Bradford, M. (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248.
94. Chamberlain, J.P. (1979). *Anal. Biochem.* 98, 132.
95. Laemmli, U.K. (1970). *Nature New Biol.* 227, 680.
96. Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). En "Molecular Cloning". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
97. Prieto, I., Lázaro, J.M., García, J.A., Hermoso, J.M. y Salas, M. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1639.
98. Karawya, E., Swack, J.A. y Willson, S. (1983). *Anal. Biochem.* 135, 318.
99. Blank, A., Silber, J.R., Thelen, M.P. y Dekker, C.A. (1983). *Anal. Biochem.* 135, 423.
100. Ivarie, R.D. y Pène, J.J. (1973). *Virology* 52, 351.

101. Sugino, A. y Bott, K.F. (1980). *J. Bacteriol.* 141, 1331.
102. McKenzie, J.M., Neville, M.M., Wright, G.E. y Brown, N.C. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 512.
103. McGuire, J.C., Gilpatrick, M.W. y Pène, J.J. (1977). *Virology* 78, 234.
104. Yoshikawa, H. e Ito, J. (1982). *Gene* 17, 323.
105. Mellado, R.P., Moreno, F., Viñuela, E., Salas, M., Reilly, B.E. y Anderson, D.L. (1976). *J. Virol.* 19, 495.
106. Sogo, J.M., Inciarte, M.R., Corral, J., Viñuela, E. y Salas, M. (1979). *J. Mol. Biol.* 127, 411.
107. Talavera, A., Salas, M. y Viñuela, E. (1972). *Eur. J. Biochem.* 31, 367.
108. Gass, K.B. y Cozzarelli, N.R. (1973). En "Methods in Enzymology" 29, 27.
109. Hirokawa, H., Matsumoto, K. y Ohashi, M. (1982). En Schlessinger, D. (ed.), *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. pp. 45-56.
110. Matsumoto, K., Saito, T. e Hirokawa, H. (1983). *Molec. Gen. Genet.* 191, 26.

111. Bessman, M.J., Muzyczka, N., Goodman, M.F. y Schnaar, R.L. (1974). *J. Mol. Biol.* 88, 409.
112. Addler, S. y Modrich, P. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 11605.
113. Nishiyama, Y., Maeno, K. y Yoshida, S. (1983). *Virology* 124, 221.
114. Knopf, K.W. (1979). *Eur. J. Biochem.* 98, 231.
115. Ostrander, M. y Cheng, Y-C. (1980). *Biochem. Biophys. Acta* 609, 232.
116. Derse, D. y Cheng, Y-C. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 8525.
117. Byrnes, J.J., Downey, K.M., Black, V.L. y So, A.G. (1976). *Biochemistry* 15, 2817.
118. Hirokawa, H. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1555.
119. Shih, M., Watabe, K. e Ito, J. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 1031.
120. De Jong, P.J., Kwant, M.M., van Driel, W., Jansz, H.S. y van der Vliet, P.C. (1982). *Virology* 124, 45.
121. Anderson, D.L. y Reilly, B.E. (1974). *J. Virol.* 13, 211.

122. Thompson, S.T., Cass, K.H. y Stellwagen, E. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 669.
123. Enomoto, T., Lichy, J.H., Ikeda, J. y Hurwitz, J. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6779.
124. Miller, R.L., Glaser, R. y Rapp, F. (1977). Virology 76, 494.
125. Miller, R.L. y Rapp, F. (1979). J. Gen. Virol. 36, 515.
126. Huan, E.S. (1975). J. Virol. 16, 298.
127. Lacks, S.A. y Springhorn, S.S. (1980). J. Biol. Chem. 255, 7467.
128. Spanos, A., Sedgwick, S.G., Yarranton, G.T., Hübscher, U. y Banks, G.R. (1981). Nucl. Acids Res. 9, 1825.
129. Stillman, B.W., Tamanoi, F. y Mathews, M.B. (1982). Cell 31, 613.
130. Friefeld, B.R., Lichy, J.H., Horwitz, M.S. y Hurwitz, J. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1589.
131. Lichy, J., Field, J., Horwitz, M.S. y Hurwitz, J. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5225.
132. Nagata, K., Guggenheimer, R., Enomoto, T., Lichy, J.H. y Hurwitz, J. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6438.

133. Stillman, B.W., Tamanoi, F. y Mathews, M.B. (1982). *Cell* 31, 613.
134. Nagata, K., Guggenheimer, R. y Hurwitz, J. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6177.
135. Guggenheimer, R., Nagata, K., Lindenbaum, J. y Hurwitz, J. (198). *J. Biol. Chem.* 12, 7807.
136. Pastrana, R., Lázaro, J.M., Blanco, L., García, J.A., Méndez, E. y Salas, M. En preparación.
137. Van der Vliet, P.C., Levine, A.J., Ensinger, M. y Gingsbergs, H.S. (1975). *J. Virol.* 15, 348.
138. Stillman, B.W. (1983). *Cell* 35, 7.
139. Nagata, K., Guggenheimer, R. y Hurwitz, J. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4266.
140. Rijnders, A.W.M., van Bergen, B.G.M., van der Vliet, P.C. y Sussenbach, J.S. (1983). *Nucleic Acids Res.* 11, 8777.
141. Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H. y Mano, Y. (1978). *Nature* 275, 458.
142. Oguro, M., Suzuki-Hori, C., Nagano, H., Mano, Y. e Ikegami, S. (1979). *Eur. J. Biochem.* 97, 603.
143. Sala, F., Parisi, B., Burroni, D., Amileni, A.R., Pedrali-Noy, G. y Spadari, S. (1980). *FEBS Lett.* 117, 93.

144. Plevani, P., Badaracco, G., Ginelli, E. y Sora, S. (1980). *Antimicrob. Agents Chemoter.* 18, 50.
145. Pedrali-Noy, G. y Spadari, S. (1980). *J. Virol.* 36, 457.
146. Dicioccio, R.A., Chadha, K. y Srivastava, B.I.S. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 609, 224.
147. Huberman, J.A. (1981). *Cell* 23, 647.
148. Krokan, H., Schaeffer, P. y De Pamphillis, M.L. (1979). *Biochemistry* 18, 4431.
149. Zimmerman, W., Chen, S.M., Bolden, A. y Weissbach, A. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 11847.
150. Van der Merf, S., Bouche, J.P., Mechali, M. y Girard, M. (1980). *Virology* 104, 56.
151. Kwant, M.M. y van der Vliet, P.C. (1980). *Nucleic Acids Res.* 8, 3993.
152. Longiaru, M., Ikeda, E., Jarkovsky, Z., Horwitz, S.B. y Horwitz, M.S. (1979). *Nucleic Acids Res.* 6, 3369.
153. Habara, H., Kano, K., Nagano, H., Mano, Y., Ikegami, S. y Yamashita, T. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 8.

154. Foster, D.A., Hantzopoulos, P. y Zubay, G.
(1982). *J. Virol.* 43, 679.
155. Oguro, M., Yamashita, T., Ariga, H. y Nagano, H.
(1984). *Nucleic Acids Res.* 12, 1077.
156. Oguro, M., Shioda, M., Nagano, H., Mano, Y.,
Hanaoka, F. y Yamada, M. (1980). *Biochem. Biophys.*
Res. Commun. 92, 13.
157. Thomas, G.P. y Mathews, M.B. (1980). *Cell* 22, 523.
158. Frank, K.B., Derse, D.D., Bastow, K.F. y Cheng,
Y. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 13282.
159. Goscin, L.P. y Byrnes, J.J. (1982). *Biochemistry*
21, 2518.
160. Hori, K., Mark, D.F. y Richardson, C.C. (1979).
J. Biol. Chem. 254, 11598.
161. Huang, W.M. y Lehman, I.R. (1972). *J. Biol. Chem.*
247, 3139.
162. Trautner, T.A., Swartz, M.N. y Kornberg, A. (1962).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 449.
163. Hall, Z.W. y Lehman, I.R. (1968). *J. Mol. Biol.*
36, 321.
164. Speyer, J.F. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
21, 6.
165. Drake, J.W., Allen, E.F., Forsber, S.A., Preparata,
R.M. y Greening, E.O. (1969). *Nature* 221, 1128.

166. Muzyczka, N., Poland, R.L. y Bessman, M.J.
(1972). J. Biol. Chem. 247, 7116.
167. Lehman, I.R. (1981). En "The Enzymes", vol. XIV,
Nucleic Acids, part A. pp. 51-65.