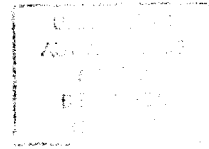


C146B

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS



LOCALIZACION Y FUNCION DE LOS DOMINIOS  
ENZIMATICOS DE LA DNA POLIMERASA I  
DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

5409897183

M<sup>a</sup> ASUNCION DIAZ CARRASCO  
MADRID, 1993

**LOCALIZACION Y FUNCION DE LOS DOMINIOS  
ENZIMATICOS DE LA DNA POLIMERASA I  
DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

Memoria presentada por la Lda. Asunción Díaz Carrasco para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, Dpto. de Biología Molecular, Febrero 1993

Director: Dra. P. López García, Investigador Científico del CSIC

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas bajo la dirección de la Dra. Paloma López García, a quien quiero expresar mi agradecimiento por su constante interés y dedicación en mi formación científica.

Igualmente agradezco al Dr. Manuel Espinosa Padrón por su continuo interés demostrado a lo largo de estos años, así como por sus valiosas sugerencias, las cuales han servido de gran ayuda para la realización de este trabajo.

Al Dr. José M. Hermoso, por aceptar la presentación de esta Memoria en el Dpto. de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Mi agradecimiento se extiende a todos mis compañeros de laboratorio, presentes y pasados, por su inestimable colaboración en la realización de esta Tesis. En especial a M<sup>a</sup> Teresa, Antonio, Sara, Gloria, Male, Susana, Pepe, Felix, y Miriam.

No quiero olvidarme tampoco de Maite Alda, Remedios Galán, Pedro Valiente y Juana Díaz, gracias por vuestra valiosa asistencia técnica.

Por último agradezco a Aurelio Hurtado, Rosa Díaz y Ricardo Uña la realización de los dibujos y fotografías de esta Tesis.

Esta Tesis ha sido realizada gracias a una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

*A mis padres, a Juan y a Tere,  
que me han ayudado todos estos años.*

# INDICE

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
- DNA POLIMERASAS BACTERIANAS.....	1
- DNA polimerasas de <i>Escherichia coli</i> .....	1
- DNA polimerasas de <i>Bacillus subtilis</i> , bacterias termófilas y cianobacterias.....	7
- DNA POLIMERASAS DE ORGANISMOS EUCARIOTICOS.....	9
- DNA POLIMERASAS DE BACTERIOFAGOS Y VIRUS ANIMALES.....	11
- CLASIFICACION DE LAS DNA POLIMERASAS MEDIANTE ANALISIS COMPARATIVO DE LAS SECUENCIAS DE AMINOACIDOS.....	12
- LA DNA POLIMERASA I DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.....	13
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES.....</b>	<b>16</b>
- ESTIRPES BACTERIANAS.....	16
- PLASMIDOS.....	17
- BACTERIOFAGOS.....	17
- OLIGONUCLEOTIDOS.....	17
- PROTEINAS.....	18
<b>METODOS.....</b>	<b>19</b>
- TECNICAS GENERALES.....	19
- Crecimiento y mantenimiento de estirpes bacterianas.....	19
- Preparación de células competentes y transformación.....	19
- Preparaciones de DNA: Extractos crudos celulares, minipreparaciones plasmídicas y preparación de plásmidos puros.....	20
- Manipulaciones enzimáticas del DNA.....	20
- Secuenciación de DNA.....	20
- Electroforesis de DNA.....	20
- Purificación de fragmentos de DNA.....	21
- Electroforesis de proteínas.....	21
- Hibridación de DNA mediante Southern.....	22
- TECNICAS ESPECIFICAS.....	22
- Determinación de los extremos 5'y 3' del RNA transcrito del gen <i>polA</i> .....	22
- Purificación de la DNA polimerasa I de <i>S. pneumoniae</i> y determinación de la secuencia del extremo amino terminal de la proteína.....	23
- Susceptibilidad de Spn PolI a subtilisina.....	23
- Valoración de actividades enzimáticas en extractos crudos.....	24

- Detección en placa de mutantes deficientes en la actividad nucleásica de Spn PolI.....	25
- Detección de actividades enzimáticas de Spn PolI en geles de poliacrilamida-SDS con DNA en la matriz.....	25
- Hiperexpresión y purificación de proteínas.....	26
- <u>Purificación de la DNA Polimerasa I de <i>S. pneumoniae</i> expresada en <i>E. coli</i></u> .....	28
- <u>Purificación de la DNA Polimerasa In620</u> .....	30
- <u>Purificación de la DNA Polimerasa In351a</u> .....	34
- Ensayos de actividad exonucleásica en proteínas puras.....	34
- Ensayo de detección de actividad correctora.....	38
- Ensayos de retraso en gel.....	41
- Determinación del número de copias.....	42
- Estabilidad plasmídica.....	42
- Geles de agarosa neutros y alcalinos utilizados en la detección de formas intermediarias de replicación.....	42
- Irradiación de cultivos celulares con luz UV y tratamiento con MMS.....	43
- Análisis por ordenador.....	43
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
- ESTRUCTURA Y EXPRESION DEL GEN POLA DE <i>S. PNEUMONIAE</i> .....	45
- Determinación de la secuencia de nucleótidos del gen <i>polA</i> de <i>S. pneumoniae</i> .....	45
- Determinación del inicio y fin del RNA transcrito del gen <i>polA</i> .....	45
- COMPARACION DE SPN POLI CON LA DNA POLIMERASA I DE <i>E. COLI</i> Y LA POLIMERASA Y EXONUCLEASA DEL FAGO T7.....	50
- PROTEOLISIS DE LA DNA POLIMERASA I DE <i>S. PNEUMONIAE</i> .....	53
- CONSTRUCCION DE DERIVADOS DEL GEN POLA DE <i>S. PNEUMONIAE</i> Y CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LOS POLIPEPTIDOS CODIFICADOS.....	55
- Construcción de derivados del gen <i>polA</i> por delección, mutagénesis insercional y fusión génica.....	55
- Identificación de las actividades enzimáticas presentes en los polipéptidos derivados de la DNA polimerasa I de <i>S. pneumoniae</i> en SDS-PAGE.....	60
- Análisis cuantitativo de las actividades enzimáticas de los polipéptidos derivados de la DNA polimerasa I de <i>S. pneumoniae</i> .....	62
- LA DNA POLIMERASA I DE <i>S. PNEUMONIAE</i> NO POSEE ACTIVIDAD EXONUCLEASICA 3'→ 5'.....	68
- Actividad exonucleolítica de la DNA polimerasa I de	

<i>S. pneumoniae</i> sobre oligonucleótidos marcados en el extremo 5'..	68
- Ausencia de actividad correctora en la DNA polimerasa I de <i>S. pneumoniae</i> .....	70
- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD EXONUCLEASICA 5'→3'.....	72
- Comparación de las actividades catalítica de Spn PolI y Eco PolI.....	72
- Concentración óptima de cationes divalentes en la catálisis de la actividad exonucleásica 5'→3'.....	74
- Productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI a partir de un oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5'.....	76
- Análisis de los productos de la reacción exonucleásica a dosis crecientes de Spn PolI.....	79
- Comparación de los productos generados por Spn PolI, Spn PolIn620 y Spn PolI351a.....	79
- Detección de los productos liberados por la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI a partir de sustratos marcados en el extremo 3'.....	82
- <u>Degradación exonucleolítica de un oligonucleótido</u> <u>marcado en el extremo 3'</u> .....	82
- <u>Actividad exonucleolítica 5'→3' sobre fragmentos de DNA</u> <u>marcados en el extremo 3'</u> .....	85
- Estudio de la interacción de Spn PolI con DNA, en ensayos de retraso de migración en geles de poliacrilamida.....	88
- PAPEL ESENCIAL DE POLI EN LA VIABILIDAD CELULAR DE S.PNEUMONIAE.....	91
- Construcción de derivados de pSM22 utilizados en la transformación cromosómica de <i>S. pneumoniae</i> 641.....	91
- Transferencia de mutaciones <i>polA</i> al cromosoma de la estirpe de <i>S. pneumoniae</i> 641.....	94
- Integración ectópica del extremo 5' del gen <i>polA</i> en el cromosoma de <i>S. pneumoniae</i> .....	99
- Transferencia de mutaciones <i>polA</i> al cromosoma de la estirpe de <i>S. pneumoniae</i> MP555.....	101
- Detección y cuantificación de los productos codificados por los genes <i>polA</i> alterados.....	104
- FUNCION DEL DOMINIO POLIMERASA DE SPN POLI EN EL ESTABLECIMIENTO Y REPLICACION DE PLASMIDOS.....	106
- Transferencia de plásmidos con origen de replicación de pLS1 a estirpes deficientes en actividad polimerásica de Spn PolI.....	106
- Función del dominio polimerasa de Spn PolI en la replicación de plásmidos con el replicón de pLS1.....	108
- <u>Estabilidad de los plásmidos con el replicón pLS1 en</u> <u>estirpes <i>polA</i> mutantes</u> .....	108

- <u>Análisis de las formas plasmídicas acumuladas en las estirpes <i>polA</i> mutantes</u> .....	113
- EFECTO DE LA IRRADIACION CON LUZ UV EN <i>S. PNEUMONIAE</i> Y <i>E. COLI</i> : REPARACION DE DNA POR SPN POLI.....	115
- Reparación de daños en el DNA inducidos por luz UV en <i>S. pneumoniae</i> .....	115
- Reparación por Spn Poli de daños en el DNA inducidos por luz UV y MMS en mutantes <i>polA</i> de <i>E.coli</i> .....	118
<b>DISCUSION</b> .....	123
- EXPRESION DEL GEN POLA DE <i>S.PNEUMONIAE</i> .....	123
- CARACTERISTICAS COMUNES Y DIFERENTES DE SPN POLI Y ECO POLI.....	125
- LA DNA POLIMERASA I DE <i>S. PNEUMONIAE</i> PERTENECE A LA FAMILIA A DE POLIMERASAS.....	127
- ACTIVIDAD EXONUCLEASICA 5'→3' DE SPN POLI.....	133
- Productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn Poli.....	133
- Cinética enzimática de los productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' en función de la concentración de Spn Poli.....	135
- Actividad exonucleásica 5'→3' de Spn Poli en fragmentos de DNA.....	137
- ESENCIALIDAD DEL GEN POLA DE <i>S. PNEUMONIAE</i> .....	139
- FUNCION DEL DOMINIO CON ACTIVIDAD POLIMERASICA DE SPN POLI EN LA TRANSFORMACION CROMOSOMICA Y PLASMIDICA.....	140
- FUNCION DEL DOMINIO DE ACTIVIDAD POLIMERASICA DE SPN POLI EN LA REPLICACION DE PLASMIDOS DERIVADOS DE PLS1.....	142
- FUNCION DE SPN POLI EN REPARACION DE DAÑOS DEL DNA EN <i>S. PNEUMONIAE</i> Y <i>E. COLI</i> .....	149
<b>CONCLUSIONES</b> .....	152
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	153



## ABREVIATURAS

A	adenosina
Å	amstrongs
Ap	ampicilina
Ap <sup>r</sup>	resistentes o resistencia a Ap
C	citidina
Cm	cloramfenicol
Cm <sup>r</sup>	resistentes o resistencia a Cm
cols	colaboradores
cpm	cuentas por minuto
Da	daltons
ddNTP	2',3'-dideoxirribonucleósido 5'-trifosfato
DEAE	dietilaminoetil
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
dNMP	2'-deoxirribonucleósido 5'-monofosfato
dNTP	2'-deoxirribonucleósido 5'-trifosfato
ds DNA	DNA de cadena doble
DTT	ditiotreitól
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico
Em	eritromicina
Em <sup>r</sup>	resistentes o resistencia a Em
G	guanosina
h	hora
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
Kb	kilobases
kDa	kilodaltons
Km	kanamicina
Km <sup>r</sup>	resistentes o resistencia a Km
min	minuto
MMS	metil metanosulfonato
mRNA	RNA mensajero
n <sup>o</sup> -mer	oligonucleótido de longitud n
NMP	ribonucleósido 5'-monofosfato
nt	nucleótidos
NTP	ribonucleósido 5'-trifosfato
PAA	poliacrilamida
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PEG	polietilenglicol

PIPES	ácido 1,4-piperazin dietanosulfónico
PMSF	fluoruro de fenilmetanosulfonilo
Rif	rifampicina
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
S	unidad de sedimentación Svedberg
s	segundo
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
Sm	estreptomicina
Sm	resistentes o resistencia a estreptomicina
ss DNA	DNA de cadena sencilla
T	timidina
Tc	tetraciclina
Tc <sup>r</sup>	resistentes o resistencia a tetraciclina
TE	Tris 10 mM:EDTA 1 mM
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina
Tris	trihidroximetil-amino-metano
tRNA	RNA de transferencia
ts	sensible a temperatura
U	unidades
UV	luz ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido

## **INTRODUCCION**

Las enzimas DNA polimerasas-DNA dependientes catalizan la formación de un enlace fosfodiéster, entre el grupo 5' fosfato del deoxinucleósido trifosfato (dNTP) que se va a incorporar, y el grupo 3' hidroxilo del último deoxinucleósido monofosfato (dNMP) ("primer terminus") de la hebra de DNA en crecimiento (DNA cebador o "primer"). La reacción de polimerización del DNA avanza en dirección 5'→3', y el deoxinucleósido trifosfato seleccionado por la DNA polimerasa ha de ser complementario al DNA molde o templado. Los productos de la reacción enzimática son dos: DNA cebador que posee un nuevo "primer terminus" y pirofosfato inorgánico (revisado en Kornberg y Baker, 1992).

Las DNA polimerasas-DNA dependientes participan en la replicación semiconservativa del DNA durante la división celular, y en la reparación de discontinuidades del DNA, generadas por procesos recombinacionales o por lesiones inducidas por agentes químicos o luz ultravioleta.

La fidelidad y la procesividad de las DNA polimerasas son dos características cuantificables, que distinguen entre sí a las DNA polimerasas encargadas de la replicación y reparación del DNA. Dichas propiedades pueden ser modificadas por el entorno celular y por la participación de otras proteínas (revisado en Kunkel, 1988).

La replicación del DNA es un proceso que requiere elevada fidelidad, para ello las DNA polimerasas poseen unos mecanismos que aseguran el correcto apareamiento de los nucleótidos en el DNA. La fidelidad es alcanzada en dos etapas:

- 1) Selección correcta del dNTP complementario al molde, durante la elongación en dirección 5'→3' en el DNA cebador.
- 2) Degradación exonucleolítica 3'→5' de un deoxinucleótido no complementario localizado en el extremo 3' de la cadena de DNA en crecimiento.

La polimerización del DNA durante la replicación también ha de ser procesiva, la DNA polimerasa se asocia ininterrumpidamente con su sustrato (DNA molde) durante múltiples y sucesivos ciclos de reacción.

Se han descrito numerosas DNA polimerasas-DNA dependientes procedentes de distintas bacterias, virus y organismos eucariotas (revisado en Kornberg y Baker, 1992). A continuación se describirán brevemente las características más relevantes de dichas polimerasas, haciendo especial énfasis en las polimerasas bacterianas, ya que en una de ellas se ha centrado nuestro trabajo experimental.

## **DNA POLIMERASAS BACTERIANAS**

### **DNA polimerasas de *Escherichia coli***

En extractos celulares de *E. coli* se detectó la primera actividad polimerásica descrita, y al polipéptido responsable de esta actividad se le denominó DNA polimerasa I (Eco PolI) (Kornberg y cols, 1956). Posteriormente, se obtuvieron mutantes en el gen *polA*, que

permitieron identificar dos nuevas polimerasas DNA polimerasa II (Eco PolII) y DNA polimerasa III (Eco PolIII).

La DNA polimerasa más estudiada a nivel bioquímico, estructural y funcional ha sido Eco PolII. Este enzima, de 103 kDa de masa molecular, posee varias actividades enzimáticas: polimerásica, dos actividades exonucleolíticas independientes con polaridad  $5' \rightarrow 3'$  y  $3' \rightarrow 5'$ , intercambio de pirofosfato y pirofosforolisis (revisado en Kornberg y Baker, 1992). Uno de los sustratos utilizados por el enzima Eco PolII es un DNA bicatenario con roturas monocatenarias en una de las hebras ("nicks"). Eco PolII es capaz de desplazar el "nick" a lo largo de la molécula del DNA ("nick translation") mediante la acción simultánea de las actividades exonucleásica  $5' \rightarrow 3'$  y polimerásica o por desplazamiento de la hebra que contiene el extremo  $5'$ -P. En el segundo caso la hebra desplazada es degradada por el ataque endonucleolítico de la actividad exonucleásica  $5' \rightarrow 3'$  de Eco PolII, siendo rellenada posteriormente la discontinuidad generada en el DNA bicatenario por la actividad polimerizante del enzima (Lundquist y Olivera, 1982).

El enzima Eco PolII es susceptible a proteolisis específica generándose dos fragmentos: uno de 35 kDa, conteniendo el dominio amino-terminal de la proteína, con actividad exonucleolítica  $5' \rightarrow 3'$ , y el otro de 68 kDa (denominado fragmento Klenow), que procede del extremo carboxilo-terminal y conserva las actividades polimerásica y exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$  (Brutlag y cols, 1969).

La determinación de la secuencia del gen *polA* (Joyce y cols, 1982), y la posterior localización de distintas mutaciones en el gen (Joyce y cols, 1985) conllevó a un primer análisis de los aminoácidos importantes para el mantenimiento de la estructura terciaria del enzima, y de aquellos otros probablemente implicados en la interacción con los sustratos y cationes divalentes. El subclonaje y sobreproducción del fragmento Klenow (Joyce y Grindley, 1983) permitió obtener suficientes cantidades de enzima para llevar a cabo su cristalización en presencia de TMP (Ollis y cols, 1985a). El estudio del cristal mostró que el fragmento Klenow posee dos dominios enzimáticos localizados en las regiones amino- y carboxilo-terminales:

1.- El dominio amino-terminal (de 200 aminoácidos) incluye un núcleo central de láminas  $\beta$  rodeadas de  $\alpha$  hélices, y es responsable de la actividad exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$ . Este dominio presenta un sitio de unión para dNMP y dos sitios (denominados A y B) de unión a cationes divalentes. Dichos cationes interactúan con la proteína y con el  $5'$ -P del TMP (Derbyshire y cols, 1988; Derbyshire y cols, 1991). Mediante mutagénesis de los aminoácidos (residuos aspárticos) que interactúan con los dos cationes divalentes, se ha podido establecer el papel esencial de los metales divalentes en la catálisis de la actividad exonucleásica  $3' \rightarrow 5'$ .

La cocrystalización del fragmento Klenow con su sustrato (DNA monocatenario) y su producto (TMP) ha permitido determinar que el TMP y el extremo  $3'$ -OH del DNA monocatenario ocupan la misma posición, pero con una conformación distinta en el centro catalítico.

El fragmento Klenow en ausencia del sustrato y del producto de la reacción une una molécula de metal divalente en el sitio A y únicamente en presencia de TMP une la segunda

molécula de metal divalente, en el sitio B, localizado a una distancia de aproximadamente 4 Å del sitio A (Beese y Steitz, 1991). Los metales divalentes que une la DNA polimerasa son  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ . Han y cols, (1991) observaron que la interacción del metal divalente en el sitio A presenta una geometría pentacoordinada y en el sitio B es de tipo octaédrica, esta información les permitió sugerir que serían  $Zn^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ , los cationes que se unirían al sitio A y B, respectivamente. El análisis del fragmento Klenow mediante resonancia magnética nuclear indica la existencia de un tercer metal divalente unido al enzima, situado en las proximidades del complejo binuclear formado por A y B, cuya función es desconocida (Han y cols, 1991).

En 1988, Freemont y cols, cocrystalizaron el fragmento Klenow con DNA parcialmente bicatenario (8 pares de bases, con 3 nt protuberantes en el extremo 5') y con DNA monocatenario (4 nt). El análisis del cocrystal mostró que 4 nt de DNA monocatenario están unidos al sitio activo exonucleásico 3'→5' del enzima, y el resto del DNA se extiende hacia el sitio activo polimerásico. Estos autores han propuesto que se produce un desapareamiento del DNA duplex, estabilizado por interacciones hidrofóbicas con las cadenas laterales de los aminoácidos del centro activo y que los dos cationes divalentes interaccionarían con el enlace fosfodiéster que va a ser hidrolizado, sugiriendo que la DNA polimerasa I de *E. coli* cataliza la reacción exonucleásica por un mecanismo que podría estar relacionado con el utilizado por los enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfatos.

2.- El dominio carboxilo-terminal del fragmento Klenow (de 400 aminoácidos) ha sido subclonado (Freemont y cols, 1986) y posee unicamente actividad polimerásica, aunque bastante reducida respecto al fragmento Klenow, debido a una disminución de la afinidad del enzima por sus sustratos dNTP y poli d(AT). En el dominio con actividad polimerásica, se distinguen dos regiones importantes: a) el sitio de unión a dNTP y b) el sitio de unión al DNA. Por mutagénesis se han identificado los aminoácidos importantes en cada región. Se ha estudiado a nivel bioquímico, en estos mutantes, las modificaciones en los parámetros enzimáticos y los residuos que forman parte del centro catalítico (Polesky y cols, 1990; Polesky y cols, 1992). A este dominio, también, se unirían 1 ó 2 cationes divalentes y se ha propuesto incluso que los grupos carboxilato de los aminoácidos del centro activo polimerásico unirían un metal divalente, que tendría un papel destacado en la catálisis. Esta hipótesis es similar al mecanismo catalítico propuesto para el centro activo exonucleolítico 3'→5' (revisado en Joyce, 1991). Se han realizado estudios de unión del fragmento Klenow a DNA y dNTP modificados, para determinar los aminoácidos que están en contacto con los dos sustratos (Basu y Modak, 1987; Basu y cols, 1988; Catalano y cols, 1990) y se ha establecido el número de pares de bases del DNA bicatenario protegidos por la interacción con el fragmento Klenow (Joyce y cols, 1986).

El dominio carboxilo-terminal del fragmento Klenow se pliega dejando una profunda hendidura con capacidad para acomodar el sustrato B-DNA. En el cristal del fragmento Klenow se observa una región desordenada compuesta por aproximadamente 64 residuos, su localización en la estructura tridimensional del polipéptido permitió sugerir a Ollis y cols, (1985a) su posible función. Dichos residuos podrían ordenarse después de la unión del DNA al fragmento Klenow

y cerrar la hendidura de la estructura tridimensional del polipéptido, lo que influiría en la procesividad del enzima. Recientemente se ha obtenido un cristal de un fragmento Klenow alterado, con mutaciones puntuales en el dominio exonucleásico 3'→5' que abolen dicha actividad, con DNA parcialmente bicatenario (7 pares de bases y 12 nt, y que posee en el extremo 3' un inhibidor suicida 2',3'-riboepoxy ATP unido covalentemente. En este cocrystal una región de la proteína unida al DNA sufre un cambio conformacional respecto a la apoproteína, el dominio desordenado interacciona con la zona bicatenaria del DNA sustrato y el extremo 3'-OH de la región monocatenaria del DNA se sitúa en el sitio activo exonucleásico (Beese y cols, 1992).

El fragmento Klenow posee dos actividades enzimáticas que deben actuar coordinadamente para asegurar una mayor fidelidad, pero los centros catalíticos responsables de dichas actividades están separados aproximadamente 33 Å. El estudio de esta cuestión además de dar información sobre cual es el mecanismo que contribuye a la fidelidad en la DNA polimerasa I, puede ser aplicado a otras polimerasas que poseen en dos subunidades distintas las dos actividades enzimáticas. El modelo aceptado actualmente es el de competición: la desestabilización del DNA bicatenario provoca un incremento en la tasa de actividad exonucleásica frente a polimerásica y esto conduce a una mayor escisión de la base mal apareada frente a la correcta. Adicionalmente la formación de un apareamiento incorrecto en el sitio activo de la polimerasa, provoca una disminución de la tasa de translocación del "primer terminus" y/o un incremento de la tasa de actividad exonucleásica relativa a la polimerasa. Este modelo podría adaptarse a la idea que sugieren Catalano y cols, (1990) y Freemont y cols, (1988). Estos autores sostienen que se produciría un deslizamiento del "primer terminus", desde el centro activo de polimerización al sitio activo exonucleásico. Este desplazamiento estaría acompañado por la desnaturalización de 4 bases del extremo 3' del DNA "primer", y por un movimiento de 7-8 pb del DNA bicatenario al interior de la hendidura del dominio carboxilo-terminal. En 1989, Joyce demostró que el fragmento Klenow es capaz de corregir la incorporación de un nucleótido mal apareado por dos vías distintas, intermolecular e intramolecular, con o sin disociación de la molécula de enzima que ha incorporado un nucleótido incorrecto en el extremo 3'-OH del DNA "primer".

La expresión celular del gen *polA* en *E. coli* es de aproximadamente 400 moléculas por célula. El papel celular de Eco PolI ha sido establecido claramente en algunos procesos, aunque en otros no se conoce aun con exactitud la acción que lleva a cabo (revisado en Savic y cols, 1990). Eco PolI interviene en la replicación del DNA cromosómico, en conjunción con la ribonucleasa H (RNasaH), es la encargada de catalizar la eliminación de los RNA "primers" de los fragmentos de Okazaki. La RNasaH procesaría los RNAs de aproximadamente 10 nt, hasta una talla de 1 a 3 nt, aunque Eco PolI podría también ejercer esta acción de forma minoritaria, y a continuación Eco PolI completaría la eliminación de los ribonucleótidos del "primer" (Kitani y cols, 1985). Dependiendo de la condiciones de crecimiento esta acción de Eco PolI es esencial para la viabilidad celular (Joyce y Grindley, 1984). Además, Eco PolI y el fragmento Klenow

sustituyen la actividad catalítica del holoenzima Eco PolIII, en dobles mutantes *dnaE pcbA1*, que codifican respectivamente para la subunidad  $\alpha$  catalítica de Eco PolIII y para la subunidad  $\beta$  de la DNA girasa (Bryan y Moses, 1988; Maki y cols, 1989). Así mismo, Eco PolI es requerida en la replicación de algunos elementos extracromosómicos como el DNA del bacteriófago M13 (Chen y Ray, 1976) y los plásmidos tipo ColE1 (Grindley y Kelly, 1976; Subia y Kogoma, 1986).

La actividad polimerásica de Eco PolI participa en las últimas etapas del proceso de reparación catalizados por la excinucleasa UvrABC (mecanismo de reparación por escisión), rellenando menos de 30 nt en la mayoría de las lesiones del DNA (Caron y cols, 1985; Cooper, 1977). La actividad exonucleasa 5'→3' está implicada principalmente en la reparación postreplicativa (Sharma y Smith, 1987).

La expresión de Eco PolI en relación a la respuesta SOS no es totalmente conocida. Tras la inducción del sistema SOS, aparece una forma alterada de Eco PolI (PolI\*), que se asocia a unos factores no identificados, incapaces de interaccionar con Eco PolI silvestre (Ruscitti y cols, 1988). Eco PolI\* podría generarse por traducción de un mRNA transcrito sintetizado a partir de un promotor interno del gen *polA*, este polipéptido tendría una masa molecular inferior a Eco PolI. Dicho promotor activado por SOS, poseería una secuencia similar a los promotores de "heat shock", y solaparía con el operador de LexA (revisado en Savic y cols, 1990). Eco PolI\* cataliza la incorporación de nucleótidos incorrectos, durante la replicación de moldes sintéticos, con una eficiencia de 10 a 100 veces superior a la detectada con Eco PolI. Así mismo, presenta una reducción en la capacidad de discriminación entre el análogo 2-amino purina y la adenina (Lackey y cols, 1985).

La función de Eco PolI en recombinación no es clara, ya que los mutantes *polA*, presentan un fenotipo hiper o hiporecombinacional, según la naturaleza circular o lineal del DNA, en la vía reparativa dependiente de RecA y RecBCD. Además, Eco PolI no parece ser requerido en los procesos de reparación de apareamientos incorrectos (revisado en Savic y cols, 1990).

Eco PolI se une a DNA de cadena sencilla (aproximadamente se sitúa una molécula de PolI cada 300 nt), en los extremos y en los "nicks" del DNA de doble cadena. Recientemente, Gilson y cols, (1990) han observado la unión de Eco PolI a las secuencias palindrómicas (PU) existentes en el genoma de *E. coli*, en un número aproximado de 1000 copias por genoma bacteriano. Además de Eco PolI existiría un complejo de 5 proteínas no identificadas capaces de unirse a PU. La función de Eco PolI en las unidades palindrómicas es desconocido.

Las DNA polimerasas II y III de *E. coli* constituyen aproximadamente el 5% de la actividad polimerásica total presente en un extracto celular. PolII está codificada por el gen *polB*, clonado recientemente por varios grupos (Bonner y cols, 1990; Chen y cols, 1990; Iwasaki y cols, 1991). Todos ellos coinciden en la estructura primaria del polipéptido, inferida a partir de la secuencia de nucleótidos, 89,9 kDa de masa molecular. Iwasaki y cols, (1991) han



determinado el sitio de iniciación del transcrito del gen *polB*, precedido por una secuencia promotora y seguido por un sitio putativo de unión a los ribosomas. Solapando con la secuencia -35 del promotor existe un operador para la proteína LexA, este hecho ha permitido sugerir a los autores que el gen *polB* podría estar regulado por la sistema SOS. Dicha hipótesis está apoyada por el aumento de transcripción del gen *polB* en presencia de ácido nalidíxico y por la identidad total existente entre las secuencias de nucleótidos de los genes *polB* y *dinA* (cuya expresión es inducible por lesiones en el DNA). Eco PolII ha sido sobreproducida y purificada, y es capaz de interactuar con las proteínas accesorias del holoenzima Eco PolIII ( $\beta$  y el complejo  $\gamma$ ). En presencia de dichas proteínas y SSB se produce un incremento de 150 a 600 veces en la procesividad, durante la polimerización de Eco PolII (Bonner y cols, 1992).

A diferencia de Eco PolI, Eco PolII y el holoenzima Eco PolIII no poseen actividad exonucleásica 5'→3'. No se han obtenido letales condicionales en el gen *polB* y no se conoce ningún efecto fenotípico derivado de mutaciones en dicho gen. Sin embargo, PolII podría ejercer un papel mutagénico, ya que es capaz de incorporar nucleótidos complementarios (generalmente dATP) en sitios abásicos (revisado en Kornberg y Baker, 1992).

El holoenzima Eco PolIII es el complejo proteico que replica el DNA genómico en *E. coli*, está compuesto por más de 20 subunidades y por dilución se disocia en distintos complejos (McHenry, 1991; Maki y cols, 1988). El "core" del holoenzima Eco PolIII lo constituyen las subunidades  $\alpha$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$ . La subunidad  $\alpha$ , es un polipéptido con actividad polimerásica (Maki y Kornberg, 1985);  $\epsilon$ , posee actividad exonucleásica 3'→5' y  $\theta$ , no tiene ninguna función adscrita, aunque podría permitir la interacción de las restantes subunidades del "core". La interacción de  $\alpha$  y  $\epsilon$  conlleva un leve incremento de la actividad polimerásica (2 veces) y un elevado aumento de la actividad exonucleásica 3'→5', aproximadamente entre 50 y 100 veces. Este hecho es debido al incremento de la afinidad por el DNA de la subunidad  $\epsilon$  al interactuar con  $\alpha$ , que implica un aumento de la fidelidad (Maki y Kornberg, 1987). El "core" posee una baja procesividad (10 nt/molécula de enzima) y existen aproximadamente 40 moléculas "core" de Eco PolIII libres en la célula, que probablemente realizan rellenos de pequeñas discontinuidades del DNA bicatenario ("gaps"). Cuando el "core" de Eco PolIII interactúa con  $\tau$ , constituye el subensamblaje PolIII', de mayor procesividad (60 nt/molécula de enzima). Las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\delta'$ ,  $\Psi$  y  $\chi$  constituyen el complejo  $\gamma$ . Dicho complejo junto a Eco Pol III' constituye Eco PolIII\*, que tras la unión a la subunidad  $\beta$ , se convierte en el holoenzima Eco PolIII, el cual posee una procesividad de polimerización superior a  $10^5$  nt incorporados/molécula de enzima (revisado en Kornberg y Baker, 1992). Recientemente Kong y cols, (1992) han cristalizado la subunidad  $\beta$ , el dímero de  $\beta$  se estructura formando un anillo dejando en el centro un orificio con capacidad para la doble hebra de DNA. El anillo está constituido internamente por 12  $\alpha$  hélices que exponen hacia el interior del anillo una distribución de cargas negativas. Estas probablemente evitan la interacción directa de la subunidad  $\beta$  con el DNA, y permiten el

deslizamiento de la subunidad  $\beta$  sobre el DNA, confiriendo una enorme procesividad al holoenzima.

Se ha propuesto un modelo para explicar como se inicia la síntesis de DNA por acción del holoenzima Eco PolIII (revisado en Kornberg y Baker, 1992). La iniciación de replicación del DNA se realizaría en dos etapas:

1) Formación del complejo de preiniciación. La subunidad  $\beta$  interaccionaría con el complejo  $\gamma$ , y tras la hidrólisis de 2 moléculas de ATP, la subunidad  $\beta$  podría unirse al DNA molde-"primer".

2) Complejo de iniciación. El "core" de Eco PolIII (con o sin  $\tau$ ) se uniría al complejo de preiniciación. En esta etapa no se requiere la hidrólisis de ATP. La presencia de  $\tau$  permitiría al holoenzima continuar la síntesis de DNA en estructuras secundarias.

El holoenzima PolIII es un heterodímero, de aproximadamente 900 kDa. Uno de los monómeros está constituido por el "core" de PolIII, un dímero  $\beta$  y dos complejos  $\gamma$ . El otro está formado por las subunidades  $\alpha$ ,  $\varepsilon$ ,  $\theta$ , 2 subunidades  $\tau$  y  $\beta$ . Cada uno de los monómeros del heterodímero PolIII lleva a cabo la replicación coordinada de las hebras líder y retrasada del DNA. A su vez el holoenzima Eco PolIII interacciona con la proteína de unión a DNA monocatenario (SSB), DNA primasa y el primosoma para dar lugar al replisoma, que es el complejo responsable de la replicación del genoma de *E. coli*. En la replicación de elementos extracromosómicos, o en procesos reparativos serían válidos otros subensamblajes de PolIII de menor procesividad.

### DNA polimerasas de *Bacillus subtilis*, bacterias termófilas y cianobacterias

El esquema de polimerasas definido en *E. coli*, parece ser en principio válido para otros organismos procariotas. El sistema bacteriano mejor estudiado, después de *E. coli*, es *B. subtilis*. En este microorganismo se ha determinado la existencia de tres DNA polimerasas (I, II y III) (Gass y Cozzarelli, 1973). PolI y PolII de *B. subtilis* (Bsu PolI y PolII) son similares estructural y funcionalmente a Eco PolI y Eco PolII.

La polimerasa más estudiada de *B. subtilis* es la subunidad catalítica de PolIII, de 103 kDa de masa molecular. Dicho polipéptido está codificada por el gen *dnaF* clonado en su totalidad por Sanjanwala y Ganesan (1991). Esta subunidad catalítica presenta varias diferencias respecto a la subunidad  $\alpha$  de Eco PolIII. El enzima posee dos actividades enzimáticas, exonucleásica 3'→5' y polimerásica, en un solo polipéptido. A nivel de secuencia de aminoácidos existe una homología del 26 % entre la subunidad  $\varepsilon$  de Eco PolIII y el dominio de actividad exonucleásica de Bsu PolIII, no observándose elevada homología entre los dominios polimerizantes de las subunidades  $\alpha$  de ambas polimerasas bacterianas (Barnes y cols, 1992). Otra característica, que diferencia la subunidad catalítica de Bsu PolIII de su homónima en *E. coli*, es su sensibilidad a 6-(p-hidroxifenilazo)-uracilo (HPUra). Este agente antimicrobiano se

une al enzima y bloquea el sitio de unión a los dNTP inhibiendo la actividad polimerizante. Se han aislado bacterias resistentes a HPUra, estos mutantes presentan un aminoácido modificado en el dominio polimerizante de Bsu PolIII (azp-12).

El estudio de distintos mutantes en la subunidad catalítica de Bsu PolIII ha permitido definir 3 dominios en el enzima: exonucleásico (con función correctora), unión a dNTP (encargado de la selección y adición del dNTP), y por último una región involucrada en la interacción con proteínas iniciadoras. En el extremo amino-terminal estaría localizado el sitio de unión a cofactores, a continuación se situaría el dominio con actividad exonucleásica 3'→5' y en el extremo carboxilo, la región que interacciona con los dNTPs (Sanjanwala y Ganesan, 1991).

La expresión del gen *dnaF* de *B. subtilis* en mutantes termosensibles de *E. coli*, que presentan mutaciones en el gen *dnaE* codificante de la subunidad  $\alpha$  de Eco PolIII, no conlleva ningún tipo de complementación. Además la sobreproducción de Bsu PolIII inhibe el crecimiento de *E. coli* (Ott y cols, 1987).

El uso cada vez mas generalizado de la técnica de reacción de polimerización en cadena, requiere la utilización de una polimerasa funcional a elevadas temperaturas. Este hecho ha conllevado al aislamiento y caracterización de varias polimerasas de bacterias termófilas durante los últimos años. Dentro de este grupo el enzima más estudiado es la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq Pol). Se ha clonado el gen codificante y purificado su producto, una DNA polimerasa de 94 kDa. Este polipéptido posee actividades exonucleásica 5'→3' y polimerásica, careciendo de la actividad exonucleásica 3'→5'. La comparación de su secuencia de aminoácidos, inferida a partir de la secuencia de DNA, con la de Eco PolI revela que existen dos grandes zonas de homología situadas en las regiones amino- y carboxilo-terminales (Lawyer y cols, 1989). Taq Pol es un enzima termoestable, que presenta su óptimo de actividad a una temperatura de 70 °C y es capaz de catalizar la reacción de "nick translation" *in vitro* (Longley y cols, 1990). Hasta el momento no se han realizado estudios de funcionalidad *in vivo* con esta polimerasa. También se han purificado DNA polimerasas de otros organismos termófilos pertenecientes al grupo de las arqueobacterias. *Sulfolobus acidocaldarius* posee una polimerasa de 100 kDa de masa molecular, que es estable hasta 80°C. Esta polimerasa posee una masa molecular y una estructura monomérica similar a Eco PolI o a las polimerasas eucarióticas tipo  $\beta$ . Sin embargo, no parece exhibir ninguna actividad exonucleásica sobre DNA monocatenario o bicatenario, y tampoco muestra las características típicas de las polimerasas de eubacterias o de eucariotas, en cuanto sensibilidad a afidicolina, ddTTP, N-etilmaleimida y sales monovalente (Elie y cols, 1989). La única polimerasa purificada a partir de *Thermoplasma acidophilum*, posee una masa molecular de 88 kDa, tiene una actividad óptima a 65°C y es similar a la polimerasa de *S. acidocaldarius* (Hamal y cols, 1990). Así mismo, se han purificado polimerasas termoestables que presentan alta fidelidad de polimerización, este es el caso de la polimerasa

de *Pyrococcus furiosus* (Lundberg y cols, 1991) que posee las actividades exonucleásica 3'→5' y polimerásica en el mismo polipéptido.

Desde el punto de vista evolutivo es importante el estudio de DNA polimerasas de procariotas fotosintéticos, ya que no existe homología entre las DNA polimerasas de plantas y de vertebrados e invertebrados, y estas cianobacterias pueden ser los ancestros de organelos fotosintéticos modernos, de plantas superiores y de algas eucarióticas. Por todo ello, se han analizado las DNA polimerasas de *Anacystis nidulans* R2. Se han detectado mediante ensayos de polimerización *in situ*, 3 polipéptidos con actividad polimerizante (con movilidades electroforéticas correspondientes a 138, 121 y 107 kDa). Una de las polimerasas (107 kDa) ha sido purificada y caracterizada, mostrando actividades polimerásica y exonucleásicas 5'→3' y 3'→5'. Este enzima es susceptible a proteolisis generando un producto con actividad polimerásica de masa molecular 74 kDa. Estas características identifican a esta polimerasa con Eco PolI, sin embargo la actividad polimerizante no es inhibida por ddNTP y no posee actividad transcriptasa reversa (Lin y cols, 1990).

## DNA POLIMERASAS DE ORGANISMOS EUCARIOTICOS

La distribución de polimerasas de organismos eucariotas es más compleja que la descrita anteriormente en organismos procariotas. Se ha determinado la existencia de 5 tipos de polimerasas distintas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\gamma$ , habiéndose observado una enorme conservación a nivel evolutivo en las polimerasas procedentes de distintos orígenes, en cuanto a la composición y características de las subunidades que las componen. En base a esta homología se ha unificado la nomenclatura, y actualmente a las polimerasas I, II, III y mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* se les denomina polimerasas  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ , respectivamente (Burgers y cols, 1990). Además en levaduras parece existir una quinta polimerasa relacionada con reparación mutagénica.

La polimerasa  $\alpha$ , en general, está compuesta de 4 subunidades de 170 kDa, 70-75 kDa, 55-60 kDa y 48-50 kDa de masa molecular. La subunidad de 170 kDa posee actividad catalítica y las dos últimas actividad primasa, no conociéndose hasta ahora la función del polipéptido de 70-75 kDa. La polimerasa  $\alpha$  procedente de distintos organismos no posee actividad exonucleásica 3'→5', aunque se ha descrito que en *Drosophyla melanogaster* existe una actividad críptica enmasacarada por la subunidad de 70-75 kDa (Cotterill y col, 1987). Al disociarse dicha subunidad del complejo, se observa una disminución de la sensibilidad a inhibidores, y un aumento de la procesividad y fidelidad de la subunidad catalítica durante la polimerización. En *S. cerevisiae* la polimerasa  $\alpha$  esta compuesta de 4 subunidades de 180 kDa, 86 kDa, 58 kDa y

49 kDa de masa molecular. La subunidad catalítica (180 kDa) es termolábil, pero aumenta su estabilidad por interacción con el polipéptido de 86 kDa, no afectando esta unión a ninguna de las características analizadas de la subunidad catalítica. Al igual que su homónima de *D. melanogaster* posee una actividad exonucleásica 3'→5', aunque en *S. cerevisiae* esta actividad no está enmascarada por la subunidad de 86 kDa (Brooke y cols, 1991). En células humanas se ha determinado que la subunidad catalítica está constituida por una familia de polipéptidos con masas moleculares entre 180 y 165 kDa. A partir de cDNA se ha obtenido un polipéptido de 165 kDa, que por modificación postraducciona (glicosilación y fosforilación) genera un polipéptido de 180 kDa, éste a su vez es susceptible a proteólisis produciéndose un derivado de 165 kDa (Hsi y cols, 1990).

Las polimerasas  $\delta$  y  $\varepsilon$ , fueron inicialmente consideradas como pertenecientes al mismo grupo, ambas poseen actividad exonucleásica 3'→5', además de su actividad polimerásica. Sin embargo, sólo la polimerasa  $\delta$  es activada por el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), confiriendo al enzima una mayor procesividad durante la polimerización. La polimerasa  $\delta$  de timo de ternera es un dímero constituido por 2 subunidades con una masa molecular de 125 y 48 kDa. Al igual que en la polimerasa  $\alpha$ , la composición de subunidades de la polimerasa  $\delta$  y sus características han sido conservadas en el proceso evolutivo desde levaduras a mamíferos, e incluso dichas subunidades pueden interactuar con proteínas auxiliares pertenecientes a otro organismo (Zhang y cols, 1991). Siegal y cols. (1992) han descrito la existencia de dos formas de polimerasa  $\varepsilon$  en timo de ternera:  $\varepsilon$  y  $\varepsilon^*$ , de 210 y 145 kDa, esta última es un producto de proteólisis de la primera. Dichos autores han sugerido que el producto proteolítico podría tener una función relevante *in vivo*. En *S. cerevisiae* las polimerasas II y III poseen similares características a las polimerasas  $\varepsilon$  y  $\delta$ . La polimerasa II es un holoenzima compuesto de 5 subunidades (200, 80, 34, 30, y 29 kDa), y al igual que en la polimerasa  $\varepsilon$  además del polipéptido de 200 kDa, se ha purificado otro de 145 kDa (PolII\*), ambos son subunidades catalíticas independientes de PCNA y poseen una actividad exonucleásica 3'→5' asociada (Hamatake, y cols, 1990).

Las tres polimerasas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\varepsilon$  son esenciales para la replicación de *S. cerevisiae*, extendiéndose esta conclusión a eucariotas superiores, donde solo se ha probado que son necesarias  $\alpha$  y  $\delta$  (Blow, 1989).

El esquema de replicación de DNA propuesto para organismos eucariotas es similar al indicado en procariotas, ya que existirían 2 polimerasas distintas implicadas en la replicación de las cadenas líder y retrasada. La polimerasa  $\alpha$ , con su actividad primasa iniciaría la síntesis de las dos hebras de DNA, encargándose posteriormente de la síntesis de la cadena retrasada debido a su baja procesividad. Las polimerasas  $\delta$  y  $\varepsilon$ , que son capaces de interactuar con las mismas proteínas auxiliares, serían responsables de la elongación de la cadena líder, y una de las antedichas polimerasas debería terminar la síntesis de la cadena retrasada. Por otra parte, la polimerasa  $\varepsilon$  estaría implicada también en procesos de reparación de DNA (Hübscher y

Thömmes, 1992).

La polimerasa  $\beta$  de mamíferos es un monómero de 39 kDa, es capaz de sintetizar DNA utilizando como molde DNA o RNA y sintetiza DNA de forma distributiva. Este enzima posee dos dominios estructurales de láminas  $\beta$ , correspondientes a los dominios catalítico y de unión a DNA. La polimerasa  $\beta$  es susceptible a proteólisis, generándose dos polipéptidos, de 8 y 31 kDa, que proceden de los extremos amino y carboxilo, respectivamente (Kumar y cols, 1990a). El polipéptido de 31 kDa posee actividad polimerásica, aunque su actividad específica es menor que en la proteína completa. El polipéptido de 8 kDa une DNA monocatenario, pero en su interacción con el sustrato protege menos nucleótidos que la proteína completa (Kumar y cols, 1990b). La polimerasa  $\beta$  es un enzima reparador, no posee actividad exonucleásica 3'→5', y sustituye a Eco PolI en procesos de replicación del genoma de *E. coli* (Sweasy y Loeb, 1992).

La subunidad catalítica de la DNA polimerasa mitocondrial ( $\gamma$ ) de *S. cerevisiae* de 143 kDa de masa molecular, está codificada por el gen *mip1* que ha sido clonado y secuenciado (Foury, 1989). Este autor comparó la secuencia de aminoácidos inferida de la secuencia de DNA con la polimerasa  $\alpha$  humana y observa cierta homología en algunos segmentos pero no en otros que deberían también conservarse. Posteriormente Ito y Braithwaite (1990) y Blanco y cols, (1991b) han relacionado la polimerasa  $\gamma$  de levaduras con Eco PolI. El enzima posee actividad exonucleásica 3'→5' y es una polimerasa requerida para la replicación *in vivo* del DNA mitocondrial. Las polimerasas  $\gamma$  de *D. melanogaster* (Kaguni y Olson, 1989) y de embrión de pollo (Kunkel y Soni, 1988), presentan una actividad exonucleásica 3'→5' específica sobre "primer termini" incorrectamente apareados. La polimerasa  $\gamma$  de *Xenopus laevis* ha sido purificada, probablemente es un holoenzima constituido por una subunidad catalítica polimerizante de masa molecular 140 kDa y dos subunidades que cosedimentan con la anterior de 30 y 40 kDa. Estos dos últimos polipéptidos no muestran actividad polimerásica, pudiendo ser integrantes del holoenzima o productos de degradación. El polipéptido de 140 kDa posee actividad exonucleásica 3'→5' y escinde preferentemente "primer termini" mal apareados (Insdorf y Bogenhagen, 1989).

## DNA POLIMERASAS DE BACTERIOFAGOS Y VIRUS ANIMALES

Las polimerasas de bacteriófagos y virus animales constituyen un grupo heterogéneo. A partir del DNA de los colifagos T4, T5, T7, PRD1 y N4 se expresan unas DNA polimerasas con elevada actividad exonucleolítica 3'→5' y con capacidad para replicar el genoma del fago. Dichos enzimas, debido a su función, poseen una elevada procesividad durante la polimerización, conferida en algunos casos por proteínas auxiliares codificadas por el bacteriófago o por el huésped. En el caso del fago T7 es necesaria la formación de un complejo entre la DNA

polimerasa y la proteína del huésped tiorredoxina, que aumenta la estabilidad del complejo polimerasa-DNA de 20 a 80 veces (Huber y cols, 1987). Esta asociación permite que la DNA polimerasa incorpore miles de nucleótidos sin disociarse del DNA (Tabor y cols, 1987). Otra polimerasa muy estudiada es la del bacteriófago  $\phi 29$  de *B. subtilis*. Este enzima posee actividades polimerásica, exonucleásica 3'→5', pirofosforolítica, y es capaz de iniciar la síntesis de DNA utilizando como "primer" la proteína p3, que está unida a ambos extremos 3' del DNA lineal de doble cadena del fago (revisado en Salas, 1991). Entre las polimerasas de virus animales (revisado en Kornberg y Baker, 1992) una de las más conocidas es la del virus herpes simplex, que manifiesta actividad polimerásica y exonucleásica 3'→5' (Marcy y cols, 1990).

### CLASIFICACION DE LAS DNA POLIMERASAS MEDIANTE ANALISIS COMPARATIVO DE LAS SECUENCIAS DE AMINOACIDOS

A partir de los datos de secuencia de aminoácidos de las distintas polimerasas se ha intentado agrupar en distintas familias y subfamilias a las polimerasas en base a su homología.

Delarue y cols, (1990) dividen a las polimerasas en 3 familias:

- Familia A compuesta por Eco PolI, Spn PolI, Taq Pol, las polimerasas de los bacteriófagos T7, T5 y SP02. Otros autores habían incluido anteriormente a algunas de estas polimerasas en la familia tipo PolI (Ollis y cols, 1985b; López y cols, 1989; Lawyer y cols, 1989; Leavitt e Ito, 1989). Posteriormente se ha incorporado a este grupo la polimerasa mitocondrial de *S. cerevisiae* (Blanco y cols, 1991b). Estas polimerasas poseen 5 regiones con elevada homología en el dominio carboxilo-terminal.

- Familia B constituida por la polimerasa  $\alpha$  humana, la polimerasa de los bacteriófagos T4,  $\phi 29$ , PRD1 y M2, las polimerasas de los virus Epstein-Barr, vaccinia, varicella-Zoster, citomegalovirus, adenovirus y la polimerasa del plásmido de levaduras pGKL1 (Wang y cols, 1989; Wong y cols, 1988; Spicer y cols, 1988; Bernad y cols, 1987; Matsumoto y cols, 1989). Estas polimerasas comparten 6 segmentos de homología variable, centrados en aminoácidos muy conservados, situados en el extremo carboxilo-terminal y con la misma disposición espacial.

- La tercera familia está constituida por la polimerasa  $\beta$  de rata y la transferasa terminal de ratón. Estas polimerasas presentan dos zonas de relativa homología en las que están conservadas determinadas posiciones.

Otros autores amplian la clasificación de las polimerasas a 4 familias:

- Blanco y cols, (1991a) dividen a las polimerasas en: la familia A integrada por las polimerasas tipo Eco PolI, la familia B que incluye a las polimerasas virales, familia C compuesta por las polimerasas celulares y por último, la familia D constituida por las polimerasas que usan como "primer" una proteína terminal.

- Ito y Braithwaite (1991) agrupan a las polimerasas en 4 familias: la familia A compuesta por polimerasas bacterianas tipo Eco PolI, polimerasas de bacteriófagos (T5, T7 y

SP02) y la polimerasa mitocondrial de levaduras; la familia B incluye la polimerasa bacteriana tipo Eco PolIII, las polimerasas de bacteriofagos (PRD1,  $\phi$ 29, M2 y T4), las polimerasas eucarióticas, las polimerasas virales y las polimerasas de plásmidos lineales eucarióticos; la familia C que engloba las polimerasas replicativas bacterianas tipo PolIII; y la familia X integrada por las polimerasas tipo  $\beta$  y transferasas terminales.

Analizando las regiones homólogas entre las distintas familias, varios autores (Blanco y cols, 1991a; Delarue y cols, 1990, Matsumoto y cols, 1989; Joyce, 1991) han sugerido que existen varios segmentos con cierta similitud entre las polimerasas de las distintas familias. Delarue y cols, (1990) y Argos, (1988) han extrapolado aún más esta correlación al observar que alguno de los segmentos homólogos presentes en la DNA polimerasas pueden ser localizados también en las DNA polimerasas-RNA dependientes y RNA polimerasas-RNA dependientes. Se ha especulado sobre el posible papel de las zonas conservadas, a partir de los datos estructurales y mutagénicos que se conocen del fragmento Klenow (Joyce, 1991), y de mutagénesis de la polimerasas de los bacteriofagos  $\phi$ 29 y PRD1 en algunos de sus dominios (Bernad y cols, 1990; Zhu e Ito, 1992). Probablemente los segmentos conservados en las distintas polimerasas están relacionados con dominios de interacción con los sustratos (DNA y dNTP) y con el centro catalítico en el dominio de la polimerasa.

La homología de las polimerasas no solo se centra en los dos tercios del extremo carboxilo-terminal de los polipéptidos sino que se extiende a tres regiones (ExoI, II y III) presentes en todas las polimerasas con actividad exonucleolítica 3'→5' (Bernad y cols, 1989). Este alineamiento ha sido modificado posteriormente en el dominio ExoI, en base a datos de mutagénesis de la polimerasa de T4 que no apoyaban la primera comparación (Reha-Krantz y cols, 1991; Reha-Krantz, 1992; Blanco y cols, 1992). Los aminoácidos conservados de los segmentos ExoI, ExoII y ExoIII se corresponden con los residuos críticos implicados en la unión a metales y catálisis de la actividad exonucleásica 3'→5' del fragmento Klenow identificados por mutagénesis y estudios de alta resolución estructural (Joyce, 1991).

## LA DNA POLIMERASA I DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Dedicamos especial atención a la polimerasa de *S. pneumoniae* ya que ha sido objeto de estudio, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. La DNA polimerasa mayoritaria de *Streptococcus pneumoniae* (Spn PolI) fue detectada en una estirpe parcialmente deficiente en nucleasas, que mostraba una actividad desoxirribonucleasa residual, adscribible a un enzima distinto de la endonucleasa y exonucleasa mayoritarias neumocócicas (Lacks, 1970). Dicho polipéptido mostraba actividad exonucleásica sobre DNA nativo y desnaturalizado, y era capaz de incorporar nucleótidos en DNA activado de esperma de salmón. Apoyado en estos resultados Lacks (1970) sugirió que este enzima podría ser equivalente a Eco PolII.

Utilizando como vector el plásmido de amplio rango de huésped pLS1 y una estirpe



---

Utilizando como vector el plásmido de amplio rango de huésped pLS1 y una estirpe receptora deficiente en nucleasas, Martínez y cols, (1986) clonaron en el plásmido pSM22 un gen de neumococos que codificaba una actividad nucleásica. Las células bacterianas que poseían el plásmido pSM22 sobreproducían un polipéptido con una movilidad electroforética correspondiente a 100 kDa. Dicho enzima muestra actividades polimerásica y nucleásica, es susceptible a proteolisis y es la polimerasa mayoritaria en *S. pneumoniae* (Martínez y cols, 1986). Estas características son compartidas con Eco PolI, hecho que permitió sugerir a los autores que habían clonado el gen *polA* codificante para la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae*. Esta hipótesis fue confirmada, al demostrarse que el gen *polA* de *S. pneumoniae* revierte el efecto fenotípico (sensibilidad a luz ultravioleta y a metilmetano sulfonato) de las mutaciones *polA5* y *polA59* de *B. subtilis*. La complementación *in vivo* prácticamente era total si el gen *polA* de neumococos estaba en multicopia, siendo menos efectiva si dicho gen estaba presente en una o dos dosis génicas (Martínez y cols, 1987). Este gen fue expresado y su producto génico sobreproducido en *E. coli*, detectándose una proteína del tamaño esperado con actividad nucleásica (Martínez y cols, 1986).

## **OBJETIVOS**

El gen *polA* que codifica para la DNA polimerasa mayoritaria de *S. pneumoniae*, objeto de este estudio, fue clonado en nuestro laboratorio en 1986. Hasta ese momento el único gen *polA* conocido a nivel de secuencia era el de *E. coli*.

Los objetivos que nos planteamos en una primera etapa fueron:

- 1) Determinación de la secuencia del gen *polA*, que codifica para Spn PolII.
- 2) Caracterización del gen *polA* de *S. pneumoniae*.
- 3) Comparación de la secuencia de aminoácidos de Spn PolII con otras polimerasas conocidas, con el fin de predecir algunas características del enzima.

En una segunda fase se pretendió localizar los dominios enzimáticos de Spn PolII mediante la construcción de mutantes, y posteriormente analizar las actividades enzimáticas de los polipéptidos derivados obtenidos, profundizando en el estudio de la actividad exonucleásica 5'→ 3' de Spn PolII.

Por último se intentó analizar la función de Spn PolII en los siguientes procesos biológicos:

- a) Viabilidad celular, mediante el análisis de la esencialidad del gen *polA*.
- b) Transformación cromosómica y plasmídica en *S. pneumoniae*.
- c) Replicación del plásmido pLS1.
- d) Reparación de daños del DNA por tratamiento con luz UV en *S. pneumoniae* y complementación heteróloga del gen *polA* de neumococos en mutantes *polA* de *E. coli*.



## **MATERIALES**

## ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes de *S. pneumoniae* utilizadas fueron:

- R61 (Lacks, 1970) en transformaciones cromosómicas y experimentos de irradiación con luz UV.
- 708 (*end1 exo2 trt1 hex4 malM594*) (Lacks, 1970) en experimentos de clonaje y en la determinación de los extremos 5' y 3' del RNA transcrito del gen *polA*.
- 641 (*end1 noz19 exo3*) (Lacks y cols, 1975) en la caracterización de productos génicos, determinación de actividades enzimáticas, transferencias plasmídicas y transformaciones cromosómicas.

Las estirpes de *S. pneumoniae* derivadas de la estirpe 641 construidas en el desarrollo de este trabajo fueron:

- MP541 [*polA*Ω(1861pb::*cat*)]
- MP551 [*polA*Ω(1052pb::*cat*)]
- MP555 [*polA*<sup>+</sup> *malM*(418pb::*φ*[*polA*'{1054pb}-*ermB*])]

Las estirpes de *S. pneumoniae* derivadas de la estirpe MP555:

- MP557 [*polA*Ω(1052pb::*cat*) *malM*(418pb::*φ*[*polA*'{1054pb}-*ermB*])]
- MP558 [*polA*Δ(376-1857pb)Ω(376pb::*cat*) *malM*(418pb::*φ*[*polA*'{1054pb}-*ermB*])]
- MP560 [*polA*Δ(184-805pb)Ω(81pb::*cat*)Ω(184pb::*pET-3b'*[591-511pb]) *malM*(418pb::*φ*[*polA*'{1054pb}-*ermB*])]

Las estirpes de *E. coli* utilizadas:

a) En los experimentos de irradiación:

- C600 [*polA*<sup>+</sup> *thr1 thi1 leu6 lacY1 fhuA21 supE44 λ*] y en la determinación de los extremos 5' y 3' del RNA transcrito del gen *polA*.
- ME1034 [*polA5 HfrH thi1 rel1 λ*]
- RS5064 [*polA480ex trpA33 λ*] (Konrad y Lehman, 1974)

b) En los experimentos de detección de la actividad correctora de la DNA polimerasa I (Kunkel y cols, 1987):

- NR9099 [Δ(*pro-lac*) *recA ara thi/F'*(*proAB lacI<sub>q</sub> lacZ ΔM15*)]
- CSH50 [Δ(*pro-lac*) *ara thi/F'*(*traD36 proAB lacI<sub>q</sub> lacZ ΔM15*)]
- MC1061 [*hsdR*<sup>+</sup> *hsdM*<sup>+</sup> *araD Δ(ara leu) Δlac1POZY galU galK strA*]

c) En el clonaje y expresión de enzimas que fueron posteriormente purificadas:

- BL21(DE3) [*F<sup>-</sup> rB mB gal ompT* (int::*Plac UV5-T7gen1 imm21 nin5*)]

La estirpe de *B. subtilis* MB11 (*lys3 metB10 hisH2*) fue utilizada en la determinación de los extremos 5' y 3' del RNA transcrito del gen *polA*.

## PLASMIDOS

Los plásmidos pSM22, pSM23 (Martínez y cols, 1986) y pSM29 (Martínez y cols, 1987) incluyen el gen *polA* silvestre. El plásmido pSM10 (Pons y cols, 1991) contiene el extremo 3' del gen *polA*. Estos plásmidos han sido utilizados en el clonaje de distintas zonas del gen *polA* y como fuente de DNA para la secuenciación de dicho gen. Otros plásmidos utilizados en los clonajes han sido pUC19 (Vieira y Messing, 1982), pLG339 (Stoker y cols, 1982), pJS3 (Ballester y cols, 1986), pJS16 (Ballester y cols, 1990), pJDC9 (Chen y Morrison, 1988) y pET-5 (Rosenberg y cols, 1987).

Los plásmidos vectores pLS1 (Stassi y cols, 1981) y pLS5 (Lacks y cols, 1986), los plásmidos recombinantes pLS69 (Stassi y cols, 1981), pLS83 y pLS86 (López y cols, 1984b) fueron empleados en experimentos de transferencia plasmídica en estirpes *polA* mutantes.

Los plásmidos construidos a lo largo del desarrollo de esta Memoria han sido: pSM28, pSM280, pSM31, pSM36, pSM37, pSM38, pSM380, pSM40, pSM41, pSM410, pSM42, pSM44, pSM45 y pSM51.

## BACTERIOFAGOS

Se utilizaron los DNA mono y bicatenarios de los bacteriófagos M13mp2 (donado por el Dr. R. Díaz Orejas), M13mp2A103 y M13mp2G103 (Kunkel y cols, 1987), estos dos últimos presentan una transversión en la posición 103, timina a adenina y timina a guanina, respectivamente. Dichas mutaciones crean un codon sin sentido en el gen *lacZ* produciendo los colifagos M13mp2A103 y M13mp2G103 placas de lisis de color azul y azul intenso, respectivamente.

## OLIGONUCLEOTIDOS

Se ha utilizado el "primer" universal oligonucleótido de 17-mer (GTAAAACGACGGCCAGT) (Sigma). El derivado 19-mer (GTAAAACGACGGCCAGTGA) obtenido por incorporación de dos residuos en el extremo 3', una guanina y una dideoxiadenina, mediante polimerización. El oligonucleótido de 16-mer (sintetizado en el CIB) (GGGCTCTTCGCTATT) que es complementario al gen *lacZ* (coordenadas 153-168), fue

convertido en 17-mer mediante incorporación de un nucleótido incorrecto guanina en lugar de adenina en su extremo 3'. Estos oligonucleótidos fueron obtenidos y purificados, como se detalla en el apartado de Métodos. Los oligonucleótidos se utilizaron como sustrato para analizar la actividad exonucleásica de Spn PolI, sus derivados y Eco PolI.

La determinación de la secuencia de las fusiones génicas (*polA-cat*) presente en los plásmidos pSM28, pSM37, pSM410 y pSM380 fue realizada empleando los siguientes "primers" oligonucleótidos (Biogen): TTGGCTTGCAGGACTGG (77-93), GCCACATCAGCTGACGA (75-91), GCTGAGTGAAGAGTCTA (98-114) y CAATGACAAGGAACAGG (68-84). Entre paréntesis se indican las posiciones relativas a la fusión génica. La fusión génica *polA-ermB* presente en el plásmido pSM42 fue secuenciada utilizando los "primers" universales oligonucleótidos 17-mer directo (GTAAAACGACGGCCAGT) y reverso (CAGGAAA-CAGCTATGAC).

## PROTEINAS

La proteína Spn PolI fue purificada a partir de *S. pneumoniae* 641[pSM22] en nuestro laboratorio por la Dra. S. Martínez, según el procedimiento publicado en López y cols, (1989). La proteína Spn PolIc269 fue purificada por M.E. Pons según se indica en Pons y cols, (1991). El esquema de purificación de las proteínas Spn PolI, Spn PolIn620 y Spn PolIn351 se recoge en los apartados de Métodos de esta Memoria.

Los enzimas Eco PolI, Eco PolIK y Taq Pol fueron suministradas por New England Biolabs, Boehringer Mannheim y Pharmacia. Estos enzimas fueron utilizados en ensayos de determinación de actividades polimerásica y exonucleásica.

El resto de los enzimas utilizados para la manipulación *in vitro* del DNA fueron obtenidos de distintas casas comerciales y empleados según las especificaciones de los suministradores.

## **METODOS**



## TECNICAS GENERALES

### Crecimiento y mantenimiento de estirpes bacterianas

El medio de crecimiento utilizado para las estirpes de *S. pneumoniae* fue un medio basado en un hidrolizado de caseína (AGCH) (Lacks, 1966). La temperatura de incubación fue de 37°C, y en condiciones microaerófilas. Estas se alcanzaron incubando los cultivos en baños termostatzados sin agitación. El medio sólido utilizado fue AGCH + agar al 1%, sobre esta capa basal conteniendo las bacterias se añadió una sobrecapa de AGCH + agar al 0,75%, para conseguir las condiciones microaerófilas de cultivo que requiere *S. pneumoniae*.

El cultivo en líquido de *E. coli* y *B. subtilis* se realizó en el medio rico TY, preparado como describen Maniatis y cols, 1982. La estirpe de *E. coli* BL21(DE3) utilizada en la hiperexpresión de proteínas se creció en el medio mineral definido M9, preparado como indican Maniatis y cols, 1982. Los cultivos de estas estirpes se realizaron a 37°C y con aireación vigorosa.

El crecimiento en masa de las células se midió por turbidimetría utilizando un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20. Se midió la absorbancia de los cultivos a las longitudes de onda de 550, 600 y 650 nm para *B. subtilis*, *E. coli* y *S. pneumoniae*, respectivamente. Además se valoró el número de bacterias de un cultivo líquido mediante plaqueo de diluciones adecuadas de este cultivo, y determinación de unidades formadoras de colonia (u.f.c.). Las estirpes de *B. subtilis* y *E. coli*, forman una colonia a partir de una bacteria del cultivo líquido, sin embargo para *S. pneumoniae* cada u.f.c. está constituida por aproximadamente 4 células (comunicación personal de S.A. Lacks).

Las estirpes de *E. coli*, *S. pneumoniae* y *B. subtilis* fueron conservadas con glicerol al 10% a -70°C. Para uso rutinario las estirpes de neumococos y *E. coli* se conservaron como cultivo líquido con glicerol al 10% a -20°C ó en medio sólido con agar al 1,5% a 4°C, respectivamente.

### Preparación de células competentes y transformación

Las estirpes de *S. pneumoniae* se pusieron en estado de competencia y se transformaron siguiendo el método descrito por Lacks (1966). Para las estirpes de *E. coli* se utilizaron dos métodos de competencia, en uno de ello las células competentes se conservaron almacenadas a -70°C (Hanahan, 1983), el otro método fue el descrito por Kushner (1978). Los transformantes de *S. pneumoniae* se seleccionaron en medio sólido conteniendo Tc (1 µg/ml), Cm (2,5 ó 5 µg/ml dependiendo del número de copias del gen *cat*), Sm (100 µg/ml), Em (1 µg/ml). Los transformantes de *E. coli* se seleccionaron en medio sólido conteniendo Ap (50 µg/ml), Km (25 µg/ml), Em (1 mg/ml) y Cm (10 µg/ml).

### **Preparaciones de DNA : Extractos crudos celulares, minipreparaciones plasmídicas y preparación de plásmidos puros**

Los extractos crudos conteniendo DNA cromosómico y plasmídico fueron preparados a partir de las estirpes de *S. pneumoniae* siguiendo el método descrito por Saunders y Guilt (1980).

Las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se realizaron siguiendo el método descrito por Birnboim y Doly (1979) para *E. coli*, y con la modificación descrita por Stassi y cols, (1981) para *S. pneumoniae*. La valoración de la concentración del DNA plasmídico se realizó mediante estimación visual comparando la muestra plasmídica con concentraciones conocidas de otros plásmidos de tamaño similar.

Los plásmidos puros fueron preparados siguiendo el protocolo descrito por Currier y Nester (1976). La valoración de la cantidad y grado de pureza del DNA plasmídico se realizó por espectrofotometría, midiendo la absorción de las muestras en un rango de longitudes de onda entre 230 y 330 nm en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-160.

### **Manipulaciones enzimáticas del DNA**

Se siguieron las instrucciones descritas por Sambrook y cols, (1989).

### **Secuenciación de DNA**

La secuencia de DNA del gen *polA* se determinó mediante el método químico de Maxam y Gilbert (1980). La secuencia de DNA de las fusiones génicas *polA-cat* y *polA-ermB* se realizó siguiendo el método de terminación de cadena de Sanger y cols, (1977). Se utilizó el kit de secuenciación de la polimerasa del bacteriofago T7 (Pharmacia) y [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP. Como DNA molde se emplearon plásmidos bicatenarios desnaturalizados por álcali (Chen y Seeburg, 1985), anillados a los "primers" oligonucleótidos adecuados.

### **Electroforesis de DNA**

La electroforesis en geles de agarosa se realizó en geles horizontales a una concentración variable de 0,8% a 1,5%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a analizar. La agarosa fue disuelta en tampón de electroforesis TAE (Tris base 40 mM, ácido acético 40 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM). A las muestras se les añadió tampón de carga BXGE (glicerol al 60%, azul de bromofenol al 0,25%, xilencianol al 0,25% y EDTA 10 mM). Las dimensiones de los geles, así como la duración de las electroforesis y el voltaje variaron según las características del DNA a analizar. Los geles fueron teñidos en el mismo tampón utilizado para la electroforesis, conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml durante 20 min y el DNA

se observó mediante iluminación con luz ultravioleta en un transiluminador de onda larga (360 nm).

La resolución de fragmentos de DNA de 50 a 500 pb se llevo a cabo en geles verticales de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) al 5% en tampón TAE, conteniendo TEMED al 0,05% y persulfato amónico al 0,12%. Las dimensiones de los geles fueron 14,5 cm de ancho, 14 cm de largo y 1,2 mm de espesor. La preparación de las muestras y la tinción de los geles se realizó como se ha descrito para los geles de agarosa.

La resolución de los productos de las reacciones de secuenciación, la determinación del tamaño de los fragmentos protegidos de la degradación por endonucleasas S1 y la detección de los productos de las reacciones exonucleásicas catalizadas por las DNA polimerasas se realizaron mediante geles de proliacrilamida-urea. El tamaño de los geles fue 36 cm de ancho, 40 cm de largo y 0,35 mm de espesor. El tampón utilizado fue TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM pH 8,3 y EDTA 2,5 mM). Los geles fueron sometidos a preelectroforesis durante una hora antes de cargar las muestras. Los geles contenían urea 8 M, modificándose la concentración de acrilamida, bisacrilamida, persulfato amónico, TEMED, molaridad del tampón de electroforesis y tiempo de duración de la electroforesis dependiendo del tamaño de los fragmentos a analizar. Las muestras de la reacciones de secuencia fueron resuspendidas en el colorante de carga BXF (formamida desionizada al 80%, NaOH 10 mM, azul de bromofenol al 0,1%, xilencianol al 0,1% y EDTA 1 mM). El tampón de carga utilizado en las muestras derivadas de las reacciones enzimáticas contenía formamida al 80%, EDTA 20 mM, SDS al 0,5%, azul de bromofenol al 0,1% y xilencianol al 0,1%. El DNA contenido en las muestras fue desnaturalizado por calentamiento a 96°C durante 3 min y rápidamente enfriadas a 4°C para evitar la renaturalización. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 1900 V.

### **Purificación de fragmentos de DNA**

La purificación de fragmentos de DNA fraccionados en geles de agarosa se realizó con el kit denominado GeneClean (BIO 101), se siguieron las especificaciones indicadas por los suministradores.

La elución de fragmentos de DNA fraccionados en PAGE se realizó mediante la escisión de un bloque de acrilamida del gel conteniendo el fragmento de DNA. El bloque se cortó en trozos pequeños y se sumergió en un tampón compuesto de NaCl 0,2 M, EDTA 2 mM y Tris-CIH 20 mM pH 7,4, donde se mantuvo 16 horas a 42°C. Se eliminaron los restos de acrilamida de la muestra pasando la suspensión a través de una columna de lana de vidrio. Posteriormente, el DNA fue precipitado con etanol.

### **Electroforesis de proteínas**

Se analizaron las proteínas presentes en los extractos crudos y las procedentes de los

fraccionamientos en columnas cromatográficas mediante PAGE-SDS. Estos geles contenían distintos porcentajes lineales o gradientes continuos de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8). Además incluían Tris-ClH 0,15 M pH 8,8, SDS al 0,1%, EDTA 2 mM, TEMED al 0,05% y persulfato amónico al 0,08%. Las dimensiones de los geles utilizados fueron 14,5 cm de ancho, 14 cm de largo y 1,2 mm de espesor, y 10 cm de ancho, 8 cm de largo y 0,75 mm de espesor. El tampón de electroforesis contenía Tris-ClH 50 mM pH 8,3, glicocola 380 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,1%. A las muestras se les añadió el tampón de carga SLB (Tris-ClH 50 mM pH 8,8, SDS al 1%, EDTA 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol a 0,20 mg/ml). Las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 95°C durante 3 min y se enfriaron lentamente a temperatura ambiente. La electroforesis se realizó a 150 V. Las proteínas se visualizaron mediante tinción del gel con una solución de azul brillante de Coomassie al 0,25% en agua:metanol:ácido acético glacial (4:5:1, en volúmenes), durante 30 ó 60 min (dependiendo del tamaño del gel) a temperatura ambiente, con agitación suave. Se eliminó el colorante no unido a las proteínas mediante lavado del gel con ácido acético glacial al 7,5% y metanol al 5%, durante diferente período de tiempo que osciló de 2 a 16 h, dependiendo del tamaño del gel.

### **Hibridación de DNA mediante Southern**

La transferencia e hibridación de DNA con una sonda radiactiva se realizó siguiendo el método descrito por Southern (1975), con las modificaciones indicadas en Sambrook y cols, (1989). La hibridación y detección de los fragmentos de DNA con una sonda no radiactiva se realizó según el protocolo de la casa suministradora del kit (Boehringer).

### **TECNICAS ESPECIFICAS**

#### **Determinación de los extremos 5' y 3' del RNA transcrito del gen *polA***

Se extrajo el RNA total de las estirpes de *S. pneumoniae*, *E. coli* y *B. subtilis* mediante el método del fenol caliente descrito en Aiba y cols, (1981), con algunas modificaciones. Se recogieron por centrifugación las células de 50 ml de un cultivo crecido hasta una absorbancia de 0,4-0,5 a las longitudes de onda especificadas en el apartado de Técnicas Generales. El sedimento celular de *S. pneumoniae* se resuspendió en 2,5 ml de solución de lisis (acetato sódico 20 mM pH 5,5, EDTA 1 mM y deoxicolato sódico al 0,1%). Los cultivos de *E. coli* y *B. subtilis* fueron resuspendidos en 2,5 ml de una solución compuesta por acetato sódico 20 mM pH 5,5, EDTA 1 mM y conteniendo 2,5 mg de lisozima. Las células se lisaron mediante tres ciclos rápidos y consecutivos de congelación a -70°C y descongelación a 37°C. A continuación se añadió SDS a una concentración final de 0,5% y se mantuvo la solución 2 min a 37°C. Los

extractos fueron tratados con 5 ml de fenol saturado con acetato sódico 20 mM pH 5,5 durante 5 min a 70°C. La fase acuosa fue nuevamente tratada con fenol, los ácidos nucleicos fueron precipitados 4 veces con acetato sódico 0,2M pH 7 y 2,5 volúmenes de etanol. El precipitado fue resuspendido en 0,5 ml de TE (10:1). Se obtuvieron aproximadamente 0,5 mg de RNA de *S. pneumoniae* y 1 mg de RNA de *E. coli* y *B. subtilis*. La determinación de la concentración de RNA en las muestras se realizó por espectrofotometría, midiendo la absorción a 260 nm. La integridad del RNA fue analizada en geles de agarosa por observación de los RNA ribosomales de las muestras.

Las sondas de DNA se prepararon mediante marcaje del extremo 5' (con polinucleótido quinasa) ó 3' (con el fragmento Klenow) de fragmentos de DNA adecuados que contuvieran los extremos putativos 5' ó 3' del RNA transcrito del gen *polA*. La marca de uno de los extremos de la cadena codificante se eliminó mediante digestión con un segundo enzima de restricción, y los fragmentos utilizados como sonda fueron purificados como se indicó anteriormente.

La reacción de hibridación se realizó mezclando en 50  $\mu$ l la sonda de DNA (30.000 cpm), RNA total (150  $\mu$ g), PIPES 40 nM pH 6,3, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM y formamida desionizada al 70%. Las mezclas fueron calentadas a 85°C 10 min, y se mantuvieron 3 h en condiciones de hibridación (45°C y 49°C, para la determinación de los sitios de iniciación y terminación de la transcripción, respectivamente). Las muestras hibridadas fueron tratadas con 50 ó 100 U de endonucleasa S1 diluida en 450  $\mu$ l de una solución que contenía acetato sódico 30 mM pH 4,6, NaCl 280 mM, ZnSO<sub>4</sub> 4,5 mM y 9  $\mu$ g de DNA de timo sonicado. Después de 20 min a 30°C, la reacción fue finalizada por enfriamiento y adición de 115  $\mu$ l de tampón de parada (acetato amónico 2,5 mM y EDTA 50 mM pH 8). Las muestras fueron fenolizadas, se añadió a la fase acuosa 10  $\mu$ g de tRNA y los ácidos nucleicos fueron precipitados con isopropanol. Las muestras fueron resuspendidas en BXF y se cargaron 3.000 cpm de la mezcla de hibridación en un gel de poliacrilamida-urea al 8%.

### **Purificación de la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* y determinación de la secuencia del extremo amino terminal de la proteína**

La purificación de Spn PolI a partir de la estirpe *S. pneumoniae* 641[pSM22] y la determinación de la secuencia amino terminal de Spn PolI estan descritas en López y cols, (1989).

### **Susceptibilidad de Spn PolI a subtilisina**

1  $\mu$ g de Spn PolI ó Eco PolI (Biolabs) fueron tratadas con 0,2 ó 0,5 ng de subtilisina (Carlsberg, Sigma Type VIII) en 10  $\mu$ l de tampón de reacción (Tris-ClH 50 mM pH 7,6 y  $\beta$ -mercaptoetanol 3mM) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron analizadas mediante fraccionamiento en SDS-PAGE.

### Valoración de actividades enzimáticas en extractos crudos

Preparación de los extractos: Las células de 1,5 ml de cultivo de neumococos, crecido hasta una absorbancia de 0,5 a 650 nm, fueron sedimentadas por centrifugación y resuspendidas en 1 ml de la solución A (Tris-ClH 10 mM pH 7,6 y ClNa 50 mM). Nuevamente, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en una solución de lisis conteniendo 30  $\mu$ l de Tris-ClH 10 mM pH 7,6, ClNa 50 mM y Tritón X100 al 0,25%. Las muestras se incubaron 10 min a 30°C, se añadieron 120  $\mu$ l de la solución A y se mantuvieron 5 min a 30°C. La viscosidad de los extractos fue reducida mediante paso a través de una aguja de 0,36 mm de diámetro. Los extractos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se repartió en alicuotas que se almacenaron a -70°C. En estos extractos se valoró la concentración de proteínas mediante el reactivo BCA (Pierce), siguiendo las instrucciones descritas en el protocolo de la casa suministradora.

La actividad polimerásica se determinó siguiendo el método descrito por Martínez y cols, (1986) y (1987) con algunas modificaciones. Las muestras se incubaron durante 30 min a 30°C en 50  $\mu$ l de una mezcla conteniendo Tris-ClH 10 mM pH 7,6,  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM, KCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,5 mM, 40  $\mu$ g de albumina de suero bovino, 1  $\mu$ g de DNA de esperma de salmón (previamente tratado con DNasa pancreática), 15  $\mu$ M de dATP, dGTP y dCTP, 3  $\mu$ M TTP y 100 nCi de [<sup>3</sup>H]TTP a 40 Ci/mmol. Las reacciones fueron terminadas por enfriamiento y la mitad de la muestra fue aplicada en filtros de DEAE (Whatman DE81), los cuales fueron lavados 6 veces con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 M, 2 veces con agua y 1 vez con etanol, y posteriormente secados. La marca radiactiva de tritio incorporada en el DNA adherido al filtro fue determinada en un contador  $\beta$  de centelleo líquido LKB-Pharmacia. Una unidad de actividad polimerásica corresponde al enzima requerido para catalizar la incorporación de un nmol de nucleótido en una hora y a 30°C.

La actividad exonucleásica 5'→3' fue determinada por incubación de 10  $\mu$ l de muestra conteniendo 0,75  $\mu$ g de proteínas del extracto crudo, durante el período de tiempo indicado en cada experimento y a 37°C. La mezcla de reacción (50  $\mu$ l) contenía Tris-ClH 10 mM pH 7,6,  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM y 25 ng de un fragmento de DNA de 2 kb marcado radiactivamente en los extremos 5' (12.500 cpm). La reacción se terminó por enfriamiento de la muestra y adición de 25  $\mu$ l de albumina de suero bovino a 500  $\mu$ g/ml y 75  $\mu$ l de ácido perclórico al 6%. Después de 20 min a 0°C, la mezcla de reacción fue centrifugada durante 10 min a -10°C y 13.000 rpm. Los productos ácido solubles presentes en 125  $\mu$ l del sobrenadante se cuantificaron mediante adición de líquido de centelleo Ready-solv HP/b a la muestra y se midió la radiactividad en un contador de centelleo. Una unidad de actividad exonucleásica corresponde al enzima requerido para catalizar la liberación de un nmol de nucleótido en una hora y a 30°C.

La actividad cloramfenicol acetil transferasa (CAT) fue valorada por el método colorimétrico de Shaw (1975). Una unidad de CAT es expresada como un nmol de cloramfeni-

col acetilado por min a 37°C.

### **Detección en placa de mutantes deficientes en la actividad nucleásica de Spn PolII**

La construcción de plásmidos derivados de pSM22 que carecieran del extremo 5' del gen *polA*, y por lo tanto expresaran una proteína sin actividad nucleásica, fue facilitada por la selección de los transformantes en placas que contenían DNA de alto peso molecular y verde de metilo. Este método fue descrito por Lacks, (1970), y básicamente consiste en que la unión del DNA y el verde de metilo da un color estable a pH 7,5. Sin embargo cuando el DNA es degradado, por la actividad nucleásica expresada en alguno de los clones, el verde de metilo se libera del DNA y a pH 7,5 pierde su color, obteniéndose alrededor de los clones que sobreexpresan una actividad nucleásica un halo claro sobre un fondo verde.

### **Detección de actividades enzimáticas de Spn PolII en geles de poliacrilamida-SDS con DNA en la matriz**

Preparación de los extractos: Las células de 1,5 ml de cultivo de neumococos crecido hasta una absorción de 0,5 a 650 nm fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en 1 ml de una solución compuesta por Tris-ClH 0,1 M pH 7,6. Nuevamente, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en una solución de lisis conteniendo 25  $\mu$ l de Tris-ClH 0,1 M pH 7,6, PMSF a 0,27  $\mu$ g/ml y Tritón X100 al 0,25%. Las muestras se incubaron 10 min a 30°C, se añadieron 75  $\mu$ l de la solución compuesta por Tris-ClH pH 7,6 0,1 M, PMSF a 0,27  $\mu$ g/ml y se mantuvieron 5 min a 30°C. La viscosidad de los extractos fue reducida mediante paso a través de una aguja de 0,36 mm de diámetro. Los extractos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes recibieron 25  $\mu$ l de SLB. Los extractos se dividieron en alícuotas que se mantuvieron a -70°C. Antes de ser analizados mediante electroforesis fueron incubados 5 min a 37°C.

La detección de actividades enzimáticas *in situ* se realizó mediante la técnica desarrollada por Rosenthal y Lacks, (1977) con algunas modificaciones. La actividad nucleásica de los extractos celulares de *S. pneumoniae* 641 conteniendo distintos plásmidos fue detectada mediante SDS-PAGE con DNA de timo no radiactivo en la matriz. El gel contenía 10% de acrilamida:bi-sacrilamida (30:0,8), Tris-ClH 0,15 M pH 8,8, SDS al 0,1%, EDTA 2 mM, DNA de timo de ternera a 10  $\mu$ g/ml, albumina de suero bovino a 13,5  $\mu$ g/ml, TEMED al 0,05% y persulfato amónico al 0,08%. El tampón de electroforesis contenía Tris-ClH 50 mM pH 8,3, glicocola 380 mM, SDS al 0,1% y EDTA 2 mM. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 150 V hasta que el colorante azul de bromofenol llegó al borde del gel. A continuación el gel fue incubado durante 1 h a 37 °C, con suave agitación, con 500 ml de una solución compuesta por Tris-ClH 40 mM pH 7,6 y MnCl<sub>2</sub> 2 mM. Se realizaron varios cambios de esta solución y se incubó en total 11 días. Este período de tiempo fue suficiente para detectar la actividad

nucleásica de Spn PolI codificada por el cromosoma. La detección de la actividad nucleásica de Spn PolI expresada a partir de un plásmido acortó el tiempo de incubación del gel a 4 días.

La actividad nucleásica de los extractos celulares de las estirpes *S. pneumoniae* *polA* mutantes se detectó en un gel conteniendo DNA radiactivo en la matriz. Este se preparó mediante marcaje de 10  $\mu\text{g}$  de DNA de timo activado en un mezcla de reacción (60  $\mu\text{l}$ ) que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol 1,25 mM, KCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  6,5 mM, Tris-ClH 45 mM pH 8, 125  $\mu\text{M}$  de dGTP, dCTP, TTP, 25  $\mu\text{M}$  dATP y 15  $\mu\text{Ci}$  de  $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$  1000 Ci/mmol, albumina de suero bovino a 0,8 mg/ml y 1,5 U de Spn PolIc269 (véase Fig. 16). Esta mezcla se incubó 30 min a 37 °C. Al gel de SDS-PAGE preparado como se indica en el apartado anterior se añadió antes de la polimerización 4  $\mu\text{g}$  de DNA de timo activado radiactivo ( $2 \times 10^6$  cpm) y 46  $\mu\text{g}$  de DNA frío. Después de la electroforesis el gel se lavó con 250 ml de una solución de Tris-ClH 40 mM pH 7,6 y  $\text{MnCl}_2$  5 mM, durante 40 min a 37°C, con agitación suave. Se realizaron en total 8 cambios del tampón de lavado, y se mantuvo el gel incubándose durante 4 días en estas condiciones. Por último se lavó con agua 30 min y se fluorografió, siguiendo el método descrito por Laskey y Mills (1975).

La actividad polimerásica de los extractos fue detectada mediante el método descrito por Spanos y cols, (1981) con algunas modificaciones. Se utilizaron geles de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) al 10% conteniendo Tris-ClH 0,15 M pH 8,8, SDS al 1%, EDTA 2 mM, DNA de esperma de salmón activado a 0,1 mg/ml, persulfato amónico al 0,1% y TEMED al 0,05%. El tampón de electroforesis utilizado fue el mismo que el indicado en el párrafo anterior. La electroforesis se desarrolló a 150 V. El gel se lavó 30 min a temperatura ambiente, con suave agitación, con 1 l de Tris-ClH 50 mM pH 7,6. Se realizaron en total 3 cambios de tampón. A continuación se mantuvo el gel 24 h a 4°C en 1 l de tampón compuesto por Tris-ClH 50 mM pH 7,6,  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM y EDTA 2 mM. Seguidamente se transfirió el gel a una solución (70 ml) conteniendo Tris-ClH 50 mM pH 7,6,  $\text{MgCl}_2$  7 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM, 12  $\mu\text{M}$  de dGTP, dCTP, TTP y 0,38 nM  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  (3000 Ci/mmol) y se incubó 16 h a 37°C con agitación suave. Transcurrido este período el gel se lavó durante 60 min a 4°C con 1 l del tampón compuesto por ácido tricloroacético al 5% y pirofosfato sódico al 1%. Se realizó un nuevo lavado, y se mantuvo en esta solución 40 h. Por último el gel se secó a vacío y se autorradiografió.

La detección de actividades enzimáticas en geles de PAA requiere que el SDS utilizado, principalmente en el tampón de electroforesis, sea fácilmente eliminado del gel mediante lavados, para permitir la renaturalización de las proteínas, y que éstas puedan ser activas enzimáticamente (Lacks y cols, 1979). En nuestros ensayos hemos utilizado SDS de la casa comercial Matheson, Coleman y Bell product DX2490 lote 27.

### Hiperexpresión y purificación de proteínas

El sistema de hiperexpresión *E. coli* BL21(DE3)[pET-5], descrito por Studier y Moffat



(1986); Rosenberg y cols, 1987 y Studier y cols, 1989, permite la elevada producción de una determinada proteína, cuyo gen codificante esté bajo el control del promotor  $\phi 10$  del fago T7.

La estirpe BL21(DE3) contiene un profago defectivo derivado de lambda lisogenizado en el cromosoma bacteriano (lisógeno DE3), que contiene el gen de la RNA polimerasa de T7 bajo el control del promotor inducible *lacUV5*. La RNA polimerasa de T7 tiene una elevada especificidad de transcripción a partir de los promotores fágicos y una alta eficiencia en la iniciación y elongación de las cadenas de RNA. Además esta estirpe carece de las proteasas codificadas por los genes *lon* y *ompT*.

El plásmido pET-5, utilizado como vector, posee el promotor del gen  $\phi 10$  del fago T7, que es reconocido por la RNA polimerasa fágica. Los plásmidos pSM23, pSM280 y pSM410, derivan del plásmido pET-5, y contienen un gen *polA* silvestre ó mutante con sus señales naturales de iniciación de la transcripción y traducción.

El sistema se induce por la adición de IPTG al medio de cultivo. En estas condiciones se inicia la producción de RNA polimerasa fágica que reconoce el promotor del gen  $\phi 10$  y transcribe a partir de éste, el gen *polA* situado detrás. La adición de Rif, que inhibe únicamente a la RNA polimerasa bacteriana, elimina gran parte de la síntesis de las proteínas codificadas por *E. coli*, produciendo una hiperexpresión específica de los genes plasmídicos correctamente orientados respecto al promotor fágico.

Para purificar Spn PolI y sus derivados, se inocularon 500 ml de medio M9 suplementado con Ap (200  $\mu\text{g/ml}$ ) con un preinóculo de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo los plásmidos pSM23, pSM280 ó pSM410. Los cultivos fueron crecidos a 37°C, con agitación vigorosa hasta una absorbancia de 0,5 a 600 nm. A continuación se añadió IPTG 1 mM y se prosiguió la incubación durante 1 h a 37°C. A este tiempo se adicionó Rif (200  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubó durante una hora más. Las células fueron recogidas por centrifugación y se concentraron 100 veces en NaCl 0,5 M, Tris-ClH 10 mM pH 7,6,  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM y EDTA 1 mM. Los extractos crudos fueron preparados mediante lisis por presión a 20.000 lb/in<sup>2</sup> con una French Press. Los siguientes pasos fueron realizados a 4°C. El extracto fue centrifugado 30 min a 15.000 rpm. El sobrenadante se denominó extracto crudo. Se añadió sulfato de estreptomicina a una concentración final de 5,8%. La suspensión se mantuvo 30 min a 4°C con suave agitación y se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 min. Al sobrenadante de sulfato de estreptomicina se le añadió sulfato amónico al 75% de saturación. Se recogió el precipitado por centrifugación y se disolvió en una solución compuesta por Tris-ClH 10 mM pH 7,6 y ClNa 500 mM. Esta suspensión fue denominada precipitado de sulfato amónico.

La concentración de proteínas de los extractos crudos fue determinada mediante el reactivo BCA (Pierce), siguiendo las instrucciones descritas en el protocolo de la casa suministradora, y en las etapas de purificación por medida de la absorción a 280 nm y sustracción de la absorción a 260 nm.

La valoración de la actividad polimerásica en las distintas etapas de la purificación de Spn PolI, se realizó en una mezcla de reacción (50  $\mu\text{l}$ ) que contenía Tris-ClH 45 mM pH 8,  $\beta$ -

mercaptoetanol 1,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,5 mM, KCl 100 mM, 45 µg de albumina de suero bovino, 1 µg de DNA de esperma de salmón activado, 15 µM de dATP, dCTP, dGTP y 3 µM TTP, 100 nCi de [<sup>3</sup>H]TTP a 40 Ci/mmol. Los ensayos se realizaron a 37°C durante 15 min. Una unidad de actividad polimerásica corresponde al enzima requerido para catalizar la incorporación de 10 nmoles de nucleótidos en 30 min y a 37°C.

En los ensayos de actividad exonucleásica realizados con las muestras obtenidas durante las distintas etapas de purificación de las proteínas, se utilizó como sustrato DNA de esperma de salmón activado marcado con Eco PolIK (fragmento Klenow de Eco PolI) y [<sup>3</sup>H]TTP. El resto de componentes de la mezcla de reacción fue el mismo que el indicado en la valoración de la actividad nucleásica de los extractos crudos. Una unidad de actividad exonucleásica corresponde al enzima requerido para catalizar la liberación de 10 nmoles de nucleótidos en 30 min y a 37°C.

#### Purificación de la DNA Polimerasa I de *S. pneumoniae* expresada en *E. coli*

La proteína Spn PolI fue purificada a partir de *E. coli* BL21(DE3)[pSM23] (Martínez y cols, 1986). El precipitado de sulfato amónico fue aplicado a una columna de agarosa (Bio-Gel A-0,5m, de Bio-Rad, de 85 cm de largo por 1,6 cm de diámetro) y eluido con el tampón de columna compuesto por Tris-ClH 10 mM pH 7,6, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, etilenglicol al 5%, suplementado con NaCl 0,5 M. Las fracciones que contenían el único pico de actividad polimerásica detectado fueron dializadas frente al tampón de columna suplementado con NaCl 50 mM y aplicado a una columna de heparina-agarosa de Bio-Rad, de 15 cm de largo y 0,9 de diámetro. Las proteínas unidas fueron eluidas con un gradiente lineal de 100 ml de NaCl (50 a 550 mM) en el mismo tampón. Las fracciones que contenían el pico de actividad polimerásica (que eluía a ClNa 0,18 M) fueron analizadas en SDS-PAGE, observándose un polipéptido mayoritario de aproximadamente 99 kDa, de masa molecular. Las fracciones que contenían Spn PolI fueron diluidas 4 veces en el tampón de columna y aplicadas a una columna de DEAE-Sephacel de Pharmacia (15 cm de largo y 0,9 cm de diámetro). La columna fue desarrollada con un gradiente lineal de 100 ml de NaCl (50-550 mM). La proteína Spn PolI eluyó a una concentración de NaCl 0,26 M.

En la Tabla I y Fig. 1 se recoge un resumen de dicha purificación. A partir de 500 ml de cultivo bacteriano se obtuvieron 0,8 mg de proteína con una actividad específica polimerásica y exonucleásica de 24 U/µg y 3 U/µg, respectivamente. La preparación de Spn PolI mostró un grado de pureza superior al 90% al ser analizada por tinción con azul brillante de Coomassie (Fig. 1, calle 7). La actividad exonucleásica de la preparación de Spn PolI detectada *in vitro* fue correlacionada con la actividad nucleásica de dicha proteína visualizada *in situ* en SDS-PAGE (Fig. 1, calles 8 y 9). Spn PolI presenta una proteólisis específica en extractos celulares de *S. pneumoniae* (véase Fig. 17A) y por tratamiento con subtilisina de la proteína purificada (véase Fig. 13). Uno de los productos de proteólisis de aproximadamente 32 kDa con actividad

Tabla I: Purificación de PolI de *S. pneumoniae*

Muestra y fracción	Proteína (mg)	Actividad*			
		Polimerasa		Exonucleasa	
		(U/mg)	Rto.(%)	(U/mg)	Rto.(%)
Extracto crudo	77,9	1.540	100	222	100
Sobrenadante Sulf. Estreptomicina	75,8	1.178	74,7	156	68,4
Precipitado Sulf. Amónico	43,3	1.512	62,0	276	69,1
Bio-Gel A-0.5m fr. 48-56	12,0	3.562	35,6	503	34,9
Heparina-Agarosa fr. 36-41	1,6	20.942	27,9	2.344	21,7
DEAE-Sephacel fr. 42-45	0,8	23.750	16,8	3.247	15,9

\* Las actividades enzimáticas se determinaron según se indica en el apartado de Hiperexpresión y purificación de proteínas de Métodos.

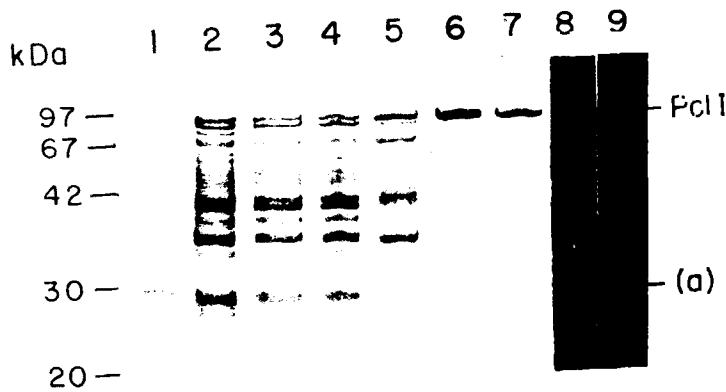


Fig. 1. Purificación de Spn PolI. Muestras de cada una de las etapas de purificación de Spn PolI se analizaron mediante SDS-PAGE (al 12% de PAA) y tinción con azul brillante de Coomassie (calles 1-7) o mediante SDS-PAGE con DNA en la matriz, detectándose la actividad nucleásica *in situ* (calles 8 y 9) por incubación a 37°C con  $MnCl_2$  2 mM. Calle 1, mezcla de proteínas estándar, cuyas masas moleculares (en kDa) están indicadas a la izquierda; 2, extracto crudo; 3, sobrenadante de la precipitación con sulfato de estreptomicina; 4, precipitado de sulfato amónico; 5, pico de la columna de filtración; 6, pico de la columna de heparina-agarosa; 7 y 8, pico de la columna de DEAE-Sephacel; 9, pico de la columna de DEAE-Sephacel, tras almacenamiento de 6 meses a -20°C. Se analizó el patrón de 8  $\mu g$  de proteínas (calles 2-5) y 3  $\mu g$  de proteínas (calles 6 y 7), y de 3 U de actividad exonucleásica (calles 8 y 9). A la derecha se indica la posición de Spn PolI (PolI) y del fragmento pequeño de proteólisis (a) con actividad nucleásica.

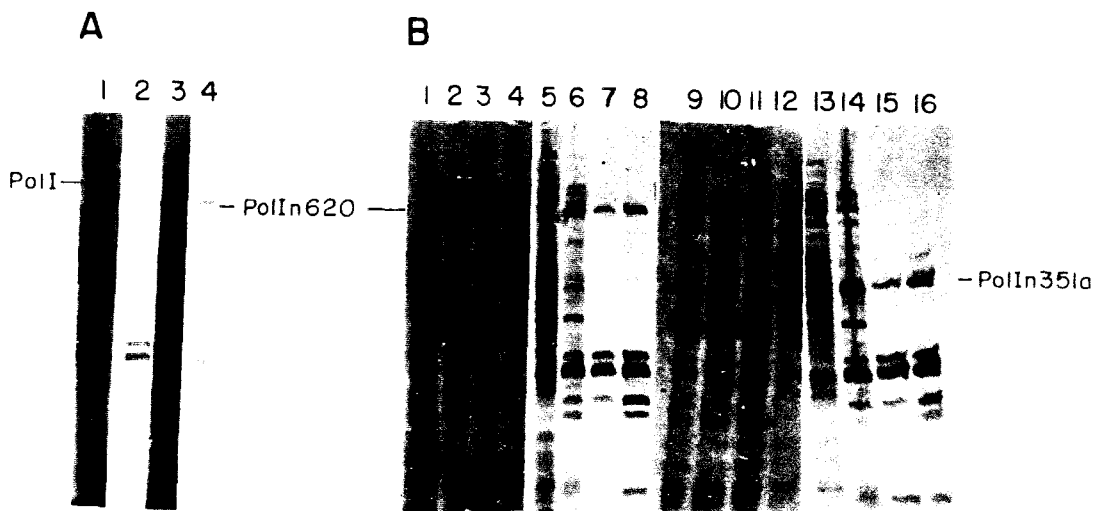
nucleásica fue detectado tras almacenamiento de la preparación de Spn PolI pura a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 6 meses (Fig. 1, calle 9).

### Purificación de la DNA Polimerasa In620

El enzima Spn PolIn620 se hiperexpresó en el sistema de *E. coli* BL21(DE3)[pSM280]. Se analizaron distintas condiciones de hiperproducción: adición de IPTG (1mM) durante 2 h (Fig. 2B, calles 2 y 6), en estas mismas condiciones se añadió a los 30 y 60 min Rif (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Fig. 2B, calles 3, 7 y 4, 8). Las condiciones óptimas de hiperexpresión del enzima fueron: incubación con IPTG durante una hora y posterior adición de Rif otra hora más (Fig. 2B, calles 4 y 8).

La proteína Spn PolIn620 se purificó a partir de la estirpe *E. coli* BL21(DE3)[pSM280] mediante filtración en agarosa. Dos picos de actividad nucleásica fueron detectados. Se analizaron las fracciones de ambos picos en geles de SDS-PAGE con DNA en la matriz, detectándose un polipéptido de aproximadamente 71 kDa, de masa molecular, correspondiente al derivado Spn PolIn620 en el primero de los dos picos. En las fracciones del segundo de los picos se observó un polipéptido de 25 kDa, con actividad nucleásica (dato no mostrado). Las fracciones del primer pico fueron dializadas y aplicadas a una columna de heparina-agarosa. Las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de 100 ml de NaCl (10 a 310 mM). Se detectó un pico con actividad nucleásica eluyendo a una concentración de NaCl 0,1 M. Este fue aplicado a una columna de DEAE-Sephacel y las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de 100 ml NaCl (100-600 mM). Se detectó un pico con actividad nucleásica, correspondiente al derivado Spn PolIn620, que eluía a una concentración de NaCl 0,26 M.

En la Tabla II se indica la actividad específica y el rendimiento alcanzado en cada una de las etapas de la purificación. La actividad específica de la proteína purificada (2,35 U/ $\mu\text{g}$ ) fue similar a la obtenida en la purificación de Spn PolI, pero el rendimiento fue menor. Este bajo rendimiento pudo ser debido a una mayor susceptibilidad a proteólisis de Spn PolIn620 (proteína truncada) o a una menor hiperexpresión de ésta frente a la proteína silvestre (Fig. 2A, calles 1 y 2 frente 1 y 4). La primera hipótesis está favorecida por la presencia de una nueva proteína con actividad nucleásica procedente de Spn PolIn620 (Fig. 3A y B, calles 4-6) no detectada en el extracto crudo (Fig. 3B, calles 1-3). Este polipéptido (denominado b en la Fig 3) migra electroforéticamente a la posición de 65 kDa, y se acumula por almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  de la proteína Spn PolIn620 purificada. Así mismo, este producto fue observado en la identificación de las actividades nucleásicas de los derivados de Spn PolI, y se visualizó en el extracto de la estirpe *S. pneumoniae* 641[pSM28] (véase Fig. 17A, calle 4). El almacenamiento conllevó también a la aparición de un polipéptido de aproximadamente 32 kDa con actividad nucleásica (Fig. 3B, calle 6) previamente detectado en la preparación de Spn PolI (véase Fig. 1).

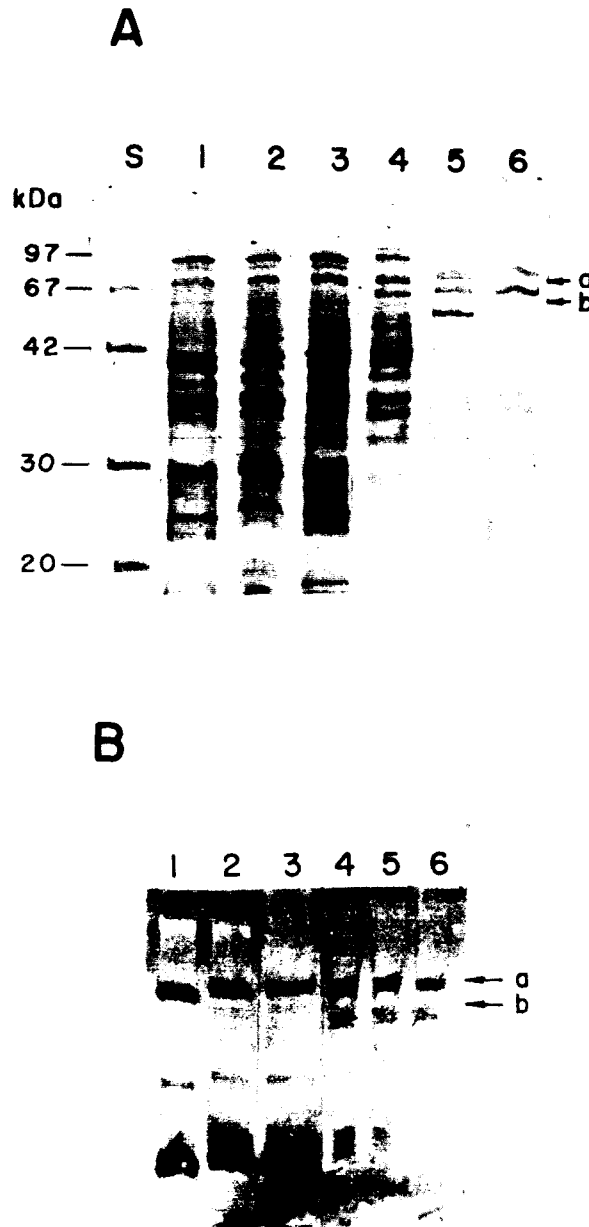


**Fig. 2. Hiperexpresión de Spn PolI, Spn PolIn620 y Spn PolIn351a.** (A) Cultivos de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido [pSM23] (calles 1 y 2) ó [pSM280] (calles 3 y 4), se incubaron durante 30 min a 37°C con 1 mM IPTG, se añadió Rif (200µg/ml) y se continuó la incubación durante 90 min más. Una alícuota de ambos cultivos fue marcada con [<sup>35</sup>S]-metionina durante 5 min, las células se lisaron y las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE al 12% de PAA. Se muestra el gel teñido con azul brillante de Coomassie (calles 1 y 3) y la autorradiografía del mismo gel (calles 2 y 4). A derecha e izquierda, se señala la posición de las proteínas hiperproducidas, PolI y PolIn620. (B) Cultivos de *E. coli* BL21(DE3) con los plásmidos [pSM280] (calles 1-8) ó [pSM410] (calles 9-16) fueron incubados 120 min con IPTG (calles 2, 6, 10 y 14), 30 min con IPTG, posterior adición de Rif e incubación durante 90 min más (calles 3, 7, 11 y 15), 60 min con IPTG, posterior adición de Rif e incubación durante 60 min más (calles 4, 8, 12 y 16). Una muestra de los cultivos no fue sometida a ningún tratamiento (calles 1, 5, 9, 13). Los cultivos se procesaron de la forma anteriormente indicada. Se muestra el gel de proteínas (calles 1-4 y 9-12) y la autorradiografía del gel (calles 5-8 y 13-16). A derecha e izquierda del panel B, se muestra la posición de las proteínas PolIn620 y PolIn351a.

Tabla II: Purificación de PolIn620 de *S. pneumoniae*

Muestra y fracción	Proteína (mg)	Actividad Exonucleasa*	
		(U/mg)	Rto.(%)
Extracto crudo	75,0	226	100
Sobrenadante Sulf. Estrept.	73,5	204	88,4
Precipitado Sulf. Amónico	35,6	415	87,1
Bio-Gel A-0.5m fr. 48-56	10,1	528	31,4
Heparina-Agarosa fr. 38-42	0,9	2.120	11,8
DEAE-Sephacel fr. 33-38	0,5	2.350	7,2

\* La actividad exonucleasa se determinó como se indica en el apartado de Hiperexpresión y purificación de proteínas de Métodos.



**Fig. 3. Purificación de Spn PolIn620.** (A) Muestras de cada una de las etapas de purificación de Spn PolIn620, fueron analizadas mediante SDS-PAGE (al 12% de PAA) y tinción con azul brillante de Coomassie. (B) De forma paralela se detectó la actividad nucleásica *in situ* presente en las muestras mediante SDS-PAGE con DNA en la matriz, e incubación a 37°C con 2 mM MnCl<sub>2</sub>. Calle 1, extracto crudo; 2, sobrenadante de la precipitación con sulfato de estreptomicina; 3, precipitado de sulfato amónico; 4, pico de la columna de filtración; 5, pico de la columna de heparina-agarosa; 6, pico de la columna de DEAE-Sephacel. Se analizó el patrón de proteínas de 8 µg (A, calles 1-5), 4 µg (A, calle 6), 3 U de actividad exonucleásica (B, calles 1-4) y 2 U (B, calles 5 y 6). A la derecha se indica la posición de Spn PolIn620 (a) y de su producto de proteólisis (b). En A, la calle S, muestra una mezcla de proteínas estándar, cuyas masas moleculares (en kDa) están indicadas a la izquierda.

### Purificación de la DNA Polimerasa In351a

El polipéptido Spn PolIn351a se hiperexpresó en la estirpe de *E. coli* BL21(DE3)[pSM410] en idénticas condiciones que el derivado Spn PolIn620 (Fig. 2B, calles 9-16).

El precipitado de sulfato amónico del extracto preparado a partir de la estirpe *E. coli* BL21(DE3)[pSM410] fue cromatografiado mediante filtración en agarosa. Se detectaron dos picos con actividad nucleásica, como en la purificación anterior, conteniendo el primero de los picos el derivado Spn PolIn351a. Las fracciones del primer pico nucleásico fueron dializadas y aplicadas a una columna de fosfocelulosa Cellex-P (Bio-Rad de 15 cm de largo por 0,9 cm de diámetro). La proteína eluyó en el volumen de exclusión y 6 de las fracciones de éste fueron aplicadas a una columna de heparina-agarosa. Las proteínas unidas fueron eluidas con un gradiente lineal de 100 ml NaCl (10 a 260 mM). Se detectó un único pico con actividad nucleásica, que eluyó a una concentración de NaCl 0,10 M.

En la Tabla III se recoge el rendimiento y actividad específica alcanzado en cada una de las etapas de la purificación de Spn PolIn351a. El grado de pureza obtenido es inferior al 50% según se muestra en la Fig. 4A, calle 6. Se detecta un producto de proteólisis con actividad nucleásica de aproximadamente 32 kDa (Fig. 4B, calle 4), similar al observado en el fraccionamiento de la proteína silvestre y el derivado Spn PolIn620.

### **Ensayos de actividad exonucleásica con proteínas puras**

En la detección y cuantificación de las actividades exonucleásicas de Spn PolII, sus derivados y Eco PolII se utilizaron distintos DNA sustratos. A continuación se indican los métodos de obtención de los distintos sustratos, basados en Tabor y cols, (1987):

1. El oligonucleótido "primer" universal 17-mer (8 ng) se marcó radiactivamente con 23  $\mu\text{Ci}$  de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (3000 Ci/mmol) y 10 U de polinucleótido quinasa. La reacción se realizó en 15  $\mu\text{l}$  conteniendo Tris-ClH 40 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y DTT 5 mM. Se incubó 45 min a 37°C y 15 min a 70°C. Posteriormente se realizó la reacción de hibridación (en 60  $\mu\text{l}$ ) del oligonucleótido marcado (15  $\mu\text{l}$ ) y la monocadena del colifago M13mp2 (5  $\mu\text{g}$ ), en presencia de  $\text{MgCl}_2$  7,5 mM y NaCl 100 mM. Se mantuvo 10 min a 65°C y 45 min a temperatura ambiente. La muestra se fenolizó, precipitó, se resuspendió en 0,2 ml de TE (10:1) y se eliminó el nucleótido no incorporado mediante elución de la muestra a través de una columna de Sephadex G-50, preparada en una jeringuilla de 1 ml.

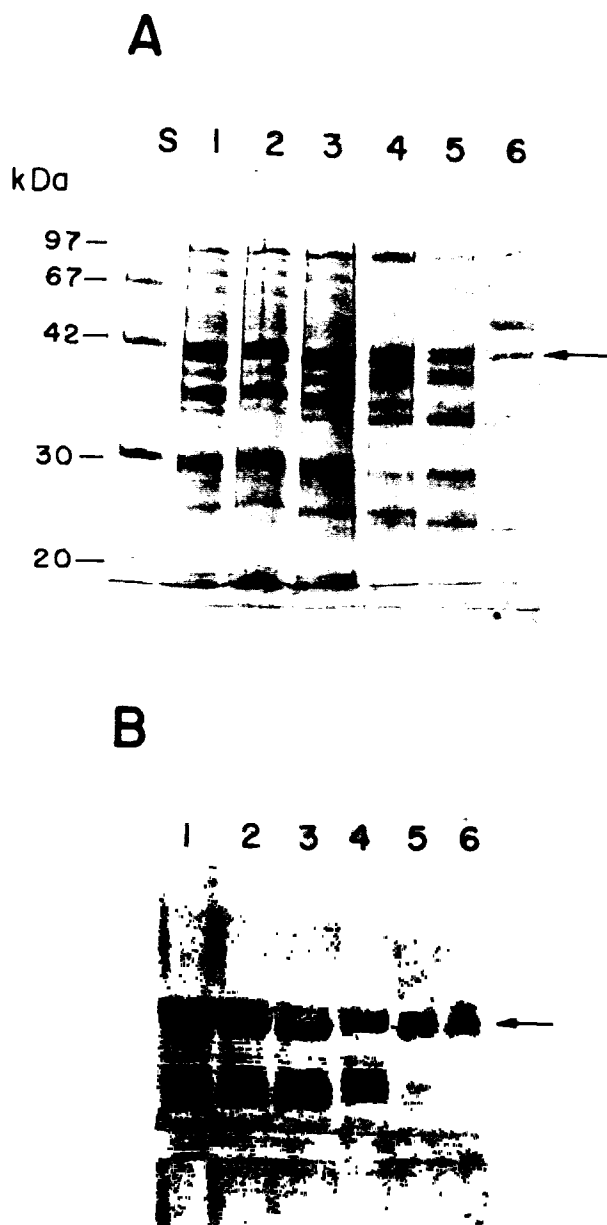
El sustrato monocatenario se obtuvo mediante incubación del oligonucleótido anillado 10 min a 95°C, ó por marcaje radiactivo en el extremo 5' del oligonucleótido 17-mer, tratamiento del DNA con fenol, fenol-cloroformo, éter, y eliminación del nucleótido no incorporado mediante elución de la muestra de DNA (200  $\mu\text{l}$ ) a través de una columna de Sephadex G-25.



**Tabla III:** Purificación de PolIn351a de *S. pneumoniae*

Muestra y fracción	Proteína (mg)	Actividad Exonucleasa*	
		(U/mg)	Rto. (%)
Extracto crudo	57,0	350	100
Sobrenadante Sulf. Estrept.	55,1	291	80,3
Precipitado Sulf. Amónico	27,3	513	70,2
Bio-Gel A-0.5m fr. 53-60	13,1	397	26,1
Cellex P fr. 12-17	3,0	767	11,7
Heparina-Agarosa fr. 31-35	0,5	2.350	6,0

\* La actividad exonucleasa se determinó como se indica en el apartado de Hiperexpresión y purificación de proteínas de Métodos.



**Fig 4. Purificación de Spn Polln351a.** (A) Muestras de cada una de las etapas de purificación de Spn Polln351a fueron analizadas mediante SDS-PAGE (al 12% de PAA) y tinción con azul brillante de Coomassie. (B) De forma paralela se detectó la actividad nucleásica *in situ* presente en las muestras mediante SDS-PAGE con DNA en la matriz, e incubación a 37°C con 2 mM MnCl<sub>2</sub>. Calle 1, extracto crudo; 2, sobrenadante de la precipitación con sulfato de estreptomicina; 3, precipitado de sulfato amónico; 4, pico de la columna de filtración; 5, pico de la columna de Cellex P; 6, pico de la columna de heparina-agarosa. Se analizó el patrón de proteínas de 8 µg (A, calles 1-5), 4 µg (A, calle 6), 1,5 U de actividad exonucleásica (B, calles 1-5) y 0,4 U (B, calle 6). A la derecha se indica con una flecha la posición de Spn Polln351a. En A, calle S, mezcla de proteínas estándar, cuyas masas moleculares (en kDa) están indicadas a la izquierda.

2. El oligonucleótido "primer" universal 17-mer se anilló en las condiciones indicadas anteriormente, la mezcla de reacción se precipitó y se resuspendió en 8,7  $\mu$ l. El oligonucleótido 17-mer anillado se convirtió en 19-mer mediante una reacción de polimerización y marcaje. Esta se realizó en 15  $\mu$ l conteniendo Tris-ClH 40 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, 23  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ddATP, dGTP 30  $\mu$ M, 13 U de sequenasa T7. Se incubó 15 min a temperatura ambiente, se trató con fenol, fenol-cloroformo, éter y se eliminaron los nucleótidos no incorporados mediante elución de la muestra a través de una columna de Sephadex G-50.

3. El oligonucleótido 16-mer (3,4 ng) (GGGCTCTTCGCTATT) fue marcado radiactivamente en el extremo 5' y anillado a la monocadena del colifago M13mp2 (2,2  $\mu$ g) en las condiciones indicadas anteriormente. Este DNA fue utilizado como sustrato en una reacción de polimerización que contenía Tris-ClH 45 mM pH 8,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,5 mM, dGTP 500  $\mu$ M, 2,5 U de SpnPolIc269. Se incubó 10 min a 37°C. El exceso de dGTP permitió la incorporación del nucleótido incorrecto, generándose un apareamiento guanina-timina. El oligonucleótido 17-mer fue purificado de un gel de acrilamida desnaturizante al 20% de PAA, y se volvió a anillar a la monocadena del fago M13mp2.

4. El fragmento de 89 pb se obtuvo mediante digestión de la forma RFI del colifago M13mp2 (10  $\mu$ g) con los enzimas *PvuII* y *EcoRI*. Los fragmentos de DNA obtenidos se fenolizaron y se precipitaron. La reacción de marcaje se realizó en un volumen de 30  $\mu$ l conteniendo Tris-ClH 40 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, 40  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ddATP y 13 U de sequenasa T7. La muestra se incubó 15 min a temperatura ambiente, se fenolizó, precipitó. El fragmento de DNA de 89 pb (*PvuII-EcoRI*) fue purificado por fraccionamiento de la muestra en un gel de PAA al 5% y elución del fragmento de 89 pb del gel. Dicha elución se obtuvo por incubación durante 16 h a 42°C en 150  $\mu$ l del tampón NaCl 0,2 M, EDTA 2 mM y Tris-ClH 20 mM pH 7,4. Se redujo el volumen de la muestra por tratamiento con butanol-1, y se eliminaron las sales del tampón por elución de la muestra a través de una columna de Sephadex G-50. El fragmento bicatenario fue desnaturizado por calentamiento a 95°C durante 10 min, en los ensayos realizados con DNA monocatenario.

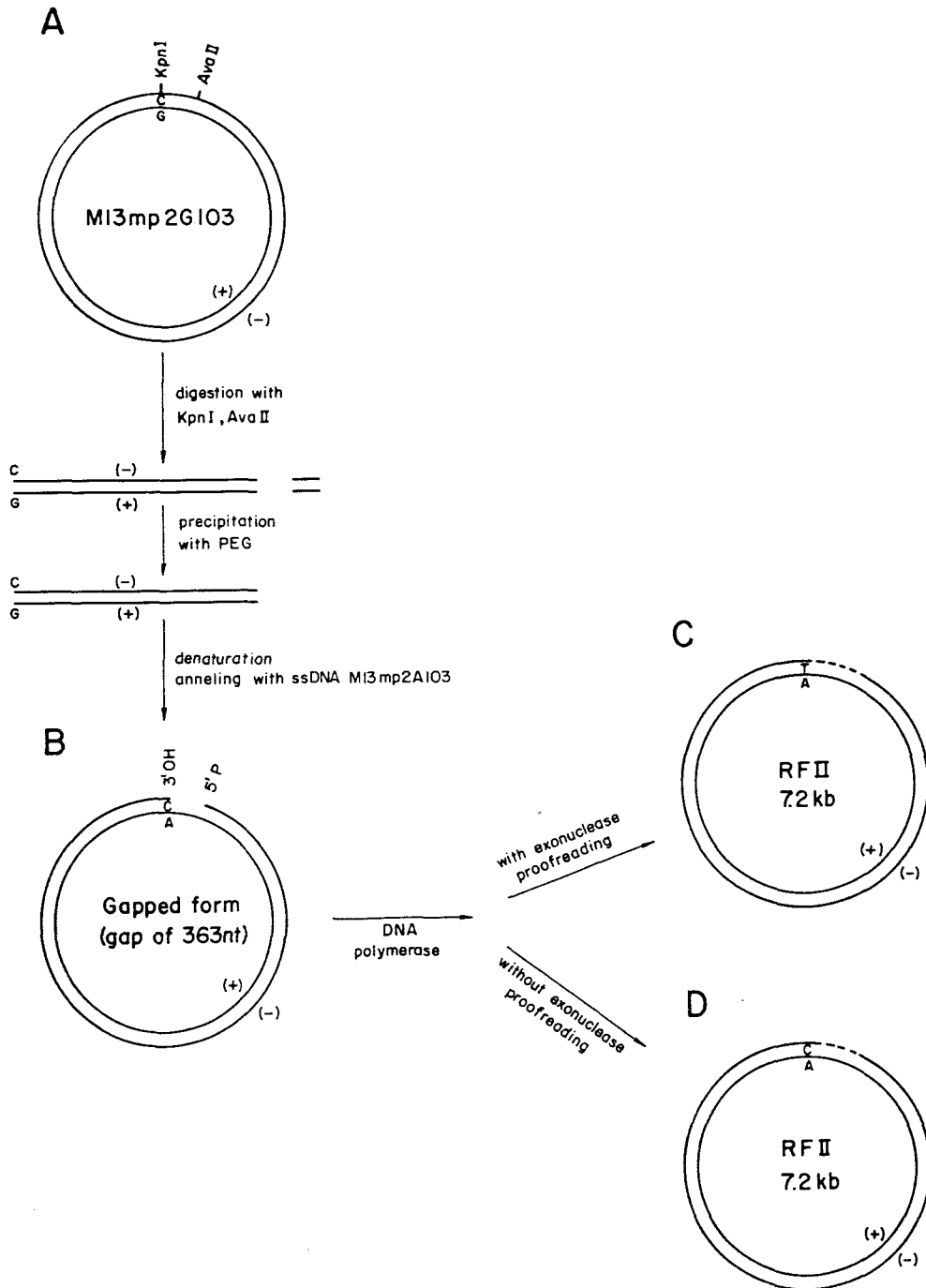
5. El fragmento de 138 pb se obtuvo mediante la digestión del plásmido pAPM30 (10  $\mu$ g) con *PstI* y *HindIII*. El DNA fue fenolizado, precipitado y marcado radiactivamente como se indica en el párrafo anterior. Los fragmentos de DNA, correspondientes a 5  $\mu$ g del plásmido inicial, fueron separados mediante electroforesis en PAA al 5%. El resto de la muestra fue suplementada con un tampón de carga conteniendo formamida al 90%, TBE 60 mM, 0,02% de azul de bromofenol y xilencianol, y calentada 3 min a 95°C. Esta muestra se sometió a una electroforesis en un gel de acrilamida desnaturizante al 6% de PAA. La electroforesis se desarrolló a 800 V hasta que el xilencianol alcanzó el borde del gel. En estas condiciones los otros dos fragmentos generados en el doble corte del plásmido pAPM30 quedaron retenidos en los pocillos del gel y se separaron las dos hebras de DNA del fragmento de 138 pb. Esta diferente migración de las dos hebras se corresponde con una diferencia de 4 nt en el tamaño de las hebras, generada por el doble corte *HindIII* y *PstI*. La purificación del fragmento de 138

pb bicatenario y monocatenario fue realizada como se indica en el párrafo anterior.

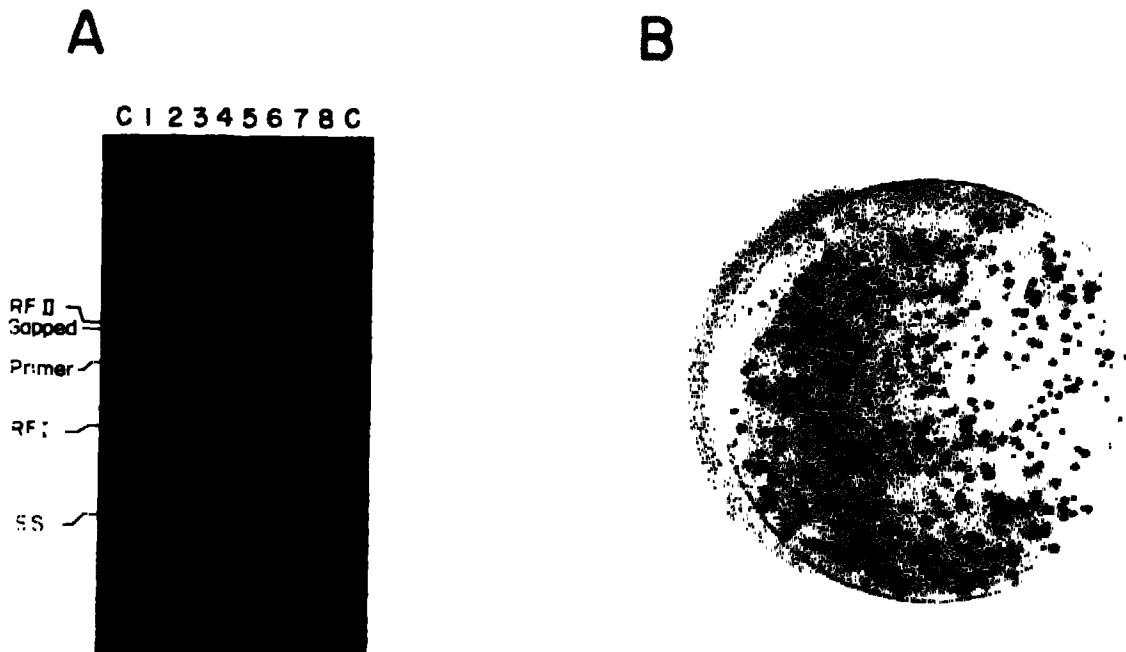
Las unidades de actividad exonucleasa de Spn PolI, sus derivados y Eco PolI utilizadas en los ensayos, el tiempo y la temperatura de la reacción, la cantidad y naturaleza del DNA sustrato utilizado se indican en cada experimento. El tampón de reacción contenía albumina de suero bovino libre de nucleasas (0,5 mg/ml), Tris-ClH 10 mM pH 7,6,  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM y como catión divalente  $MnCl_2$  5 mM ó  $MgCl_2$  10 mM. La mezcla de reacción fue preincubada 1 min a la temperatura de reacción del ensayo, y posteriormente se incorporó el enzima diluida en Tris-ClH 10 mM pH 7,6,  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM y 0,5 mg/ml de albumina de suero bovino. Las reacciones fueron paradas por la adición de EDTA 50 mM. Se añadió a la reacción un volumen del tampón de carga (formamida al 80%, EDTA 20 mM, SDS al 0,5%, 0,1% de azul de bromo fenol y xilencianol), se calentó la muestra 3 min a 95°C y se analizaron los productos de la reacción en geles de poli(acrilamida-urea) 7 M al 20% de PAA. Las bandas se cuantificaron por dos métodos, en el primero se cortó el trozo de gel conteniendo la banda de DNA y se midió la radiactividad con líquido de centelleo; en el segundo se sometió la autorradiografía del gel a un análisis por densitometría con un Scanner LKB Ultrosan 2202 acoplado a un computador Apple II.

### Ensayo de detección de actividad correctora

Este ensayo fue descrito por Kunkel y cols, (1987). La obtención del sustrato (DNA "gapeado") del ensayo se realizó a partir de DNA de los fagos M13mp2G103 y M13mp2A103. La presencia de una guanina (transversión T a G) en la posición 103 del gen *lacZ $\alpha$*  del colifago M13mp2G103 generó un sitio único *KpnI*. La digestión del DNA bicatenario de dicho fago (Fig. 5A) con *KpnI* y *AvaII* generó dos fragmentos que fueron separados por precipitación diferencial con PEG al 6%. El fragmento grande *AvaII-KpnI* fue desnaturalizado por calor y anillado a la monocadena del fago M13mpA103. De esta manera se obtuvo un DNA bicatenario con un "gap" de 363 nt, que contiene un par de bases citosina-adenina apareadas en el 3'-OH "primer terminus" del DNA (Fig. 5B). La forma de DNA "gapeada" se purificó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Este DNA se utilizó como sustrato en una reacción de polimerización *in vitro* con distintas polimerasas. Las mezclas de reacción (50  $\mu$ l) contenían 0,3  $\mu$ g de DNA "gapeado", Tris-ClH 45 mM pH 8, DTT 2mM,  $MgCl_2$  6,5 mM ó  $MnCl_2$  5 mM, dNTPs a la concentración indicada en cada ensayo y 2,5 U de Spn PolI, Eco PolI ó Taq Pol. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante el tiempo indicado en cada ensayo. La reacción se terminó por adición de EDTA 15 mM. La compleción de esta reacción fue controlada mediante análisis de 20  $\mu$ l de la muestra por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. El producto de la reacción obtenido fue la forma intermediaria de replicación RFII del fago M13. En la Fig. 6A se muestran los productos generados en función de la concentración de enzima Spn PolI utilizada en los ensayos. Con una segunda muestra del ensayo (8  $\mu$ l) se transformó *E. coli*



**Fig. 5.** Moléculas de DNA del fago M13mp2 presentes en el ensayo de detección de actividad correctora. (A) Se utilizó DNA bicatenario del fago M13mp2G103 para la obtención de la forma "gapeada" (B) que presenta un "gap" de 363 nt y un par de bases mal apareadas en el "primer terminus". La polimerización del "gap" con una DNA polimerasa que elimine previamente la base mal apareada, permite la obtención de forma mayoritaria de la molécula (C), por el contrario si no es corregido el mal apareamiento, se logró la molécula (D).



**Fig. 6. Ensayo de detección de actividad correctora.** (A) La conversión de la forma "gapeada" a RFI del fago M13mp2, se comprobó por separación, en un gel de agarosa al 0,8%, de las distintas formas de DNA presentes en la mezcla de reacción. Esta contenía 300 ng de DNA (forma "gapeada"), 10  $\mu$ M dNTP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, y distintas cantidades de Spn PolI, 1,2 U (calles 1 y 2), 0,6 U (calles 3 y 4), 0,3 U (calles 5 y 6) y 0,1 U de actividad polimerásica (calles 7 y 8). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 5 min (calles 2, 4, 6 y 8) y 15 min (calles 1, 3, 5 y 7). Las calles C, contienen una mezcla de formas de DNA del fago M13mp2: DNA monocatenario (ss), DNA bicatenario circular covalentemente cerrado (RFI), DNA bicatenario lineal ("Primer"), DNA bicatenario circular con un "gap" de 363 nt ("Gapped") y DNA bicatenario circular con una rotura monocatenaria en una de las hebras (RFII). (B) Placas de lisis de color azul intenso y azul claro producidas por la infección de la estirpe *E. coli* CSH50 con los fagos M13mp2G103 y M13mp2A103, respectivamente.

MC1061. La mezcla de transformación fue plaqueada junto con las células de *E. coli* CSH50, y se contaron las placas de M13 resultantes, diferenciando placas de color azul y azul intenso.

En el ensayo de detección de actividad correctora, el relleno del "gap" del DNA sustrato si es catalizado por una DNA polimerasa con actividad exonucleolítica correctora, genera de forma mayoritaria moléculas RFII que contienen el apareamiento correcto A-T en la posición 103 del gen *lacZ $\alpha$*  (Fig. 5C). Por el contrario, en ausencia de actividad correctora se producen principalmente moléculas RFII con el par de bases incorrectamente apareadas en dicha posición (Fig. 5D). La transformación de *E. coli* MC1061 con la mezcla de reacción y posterior plaqueo de la transformación junto con las células de *E. coli* CSH50, produce placas de M13 azules debido a la acción de la  $\beta$ -galactosidasa sobre el sustrato X-Gal presente en el medio de cultivo (Fig. 6B). La transformación con el producto RFII de una DNA polimerasa correctora da lugar mayoritariamente a placas de color azul claro. Mientras que, la infección con moléculas RFII con un par de bases mal apareadas, conlleva la aparición a un 50% de los dos fenotipos de placas, azul claro y azul intenso, como consecuencia de la infección con cada una de las hebras de DNA de la forma RFII.

### Ensayos de retraso en gel

El fragmento de DNA utilizado en este ensayo se obtuvo mediante digestión del plásmido pSM29 (5  $\mu$ g) con los enzimas *HpaII* y *NcoI*. El marcaje se realizó en un volumen de 30  $\mu$ l conteniendo Tris-ClH 45 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 6,5 mM, DTT 5 mM, 20  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol). Se incubó 15 min a temperatura ambiente. La banda de 301 pb se purificó como se ha descrito para los fragmentos utilizados como sustratos en el apartado de Ensayos de actividad exonucleásica con proteínas puras. El marcaje del DNA generó un fragmento de DNA conteniendo un residuo citosina radiactivo en cada uno de los extremos 3' del fragmento, manteniendo los extremos 5' protuberantes con una región monocatenaria constituida por 1 y 3 nt.

La reacción de unión de Spn PolI ó Spn PolIc269 se realizó en un volumen de 20  $\mu$ l conteniendo 0,5 ng del fragmento de DNA (nativo ó desnaturalizado 10 min a 95°C), Tris-ClH 10 mM pH 7,6, DTT 1 mM, 0,05 mg/ml de albumina de suero bovino y MgCl<sub>2</sub> 10 mM ó MnCl<sub>2</sub> 5 mM. En algunos ensayos se incorporó al tampón de reacción KCl 50 mM. Las muestras se preincubaron 1 min a 20°C, a continuación se adicionó el enzima diluida en Tris-ClH 10 mM pH 7,6, albumina de suero bovino a 0,5 mg/ml y  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM. Se continuó la incubación a 20°C durante 15 min, transcurrido este tiempo se paró la reacción por enfriamiento y se añadió a las muestras el tampón de carga BXGE. Se analizaron los distintos complejos generados por la unión del enzima al DNA en un gel de PAA al 5% que había sido previamente preelectroforetizado 2 h a 4°C a 150 V en tampón TBE.

### Determinación del número de copias

La determinación del número de copias está basada en el método de Projan y cols, (1983). Se utilizó para determinar el número de copias relativo del plásmido pLS86 en estirpes de *S. pneumoniae* deficientes en la actividad polimerásica de Spn PolI.

Se prepararon los extractos crudos de DNA como se indicó en el apartado de Técnicas Generales. Se separó el DNA presente en las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en tampón TAE a 2,5 V/cm durante 14 h. Los geles se tiñeron durante 30 min en el mismo tampón conteniendo bromuro de etidio a 1 µg/ml. A continuación se mantuvieron 1 h en agua destilada, para reducir la fluorescencia del fondo. Los geles se fotografiaron, y los negativos se sometieron a densitometría.

El grupo planar del bromuro de etidio se intercala mejor en formas lineales y circulares abiertas (OC), que en formas circulares covalentemente cerradas (CCC), es necesario aplicar un factor de corrección en el cálculo del número de copias de plásmido respecto al cromosoma:

$$n = \frac{(Dp_1 + 1,36 Dp_2) \times Mc}{Dc \times Mc}$$

siendo:  $Dp_1$  y  $Dp_2$ , el valor determinado por densitometría para las bandas correspondientes a las formas OC y CCC del plásmido.  $Mc$ , el tamaño del DNA genómico de *S. pneumoniae* estimado en  $2,27 \times 10^6$  pb (comunicación personal de A.M. Gasc).  $Dc$ , el valor determinado por densitometría para la banda correspondiente al DNA cromosómico.  $Mp$ , es el tamaño del DNA plasmídico en pb.

### Estabilidad plasmídica

Se prepararon cultivos de las estirpes *S. pneumoniae* silvestre y mutantes *polA*, conteniendo el plásmido pLS86, en medio líquido selectivo (Tc 1 µg/ml), y se crecieron hasta una absorción de 0,5 a 650 nm, estos cultivos de partida fueron considerados la generación 0. A continuación se realizaron sucesivas diluciones del cultivo en una proporción 1:1023, en medio sin antibiótico, hasta alcanzarse la misma absorbancia. El número de generaciones transcurridas entre dos diluciones fueron 10. Se tomaron muestras de los cultivos que fueron plaqueadas en medio de cultivo sin y con presión selectiva, para determinar el porcentaje de células con plásmido.

### Geles de agarosa neutros y alcalinos utilizados en la detección de formas intermediarias de replicación

Los extractos crudos de DNA se prepararon como se indicó en el apartado de Técnicas



Generales. Dichos extractos fueron tratados con fenol, fenol-cloroformo y precipitados. Se resuspendieron en un volumen adecuado y una muestra (4  $\mu\text{g}$  de DNA) se sometió a electroforesis en geles neutros de agarosa al 0,8%. Parte del extracto crudo (6  $\mu\text{g}$ ) fue digerido en un volumen de 60  $\mu\text{l}$  con *EcoRI*, posteriormente el DNA fue fenolizado, precipitado y se resuspendió en 7,5  $\mu\text{l}$ . Se añadió el tampón de carga NaOH 50 mM, EDTA 5 mM, ficoll al 3%, verde de bromocresol al 0,015% y xilencianol al 0,25%. Se analizaron 4  $\mu\text{g}$  de DNA digerido en un gel de agarosa alcalino al 0,8% (según el método indicado en Sambrook y cols, 1989). La electroforesis se desarrolló a 40 V en el tampón NaOH 50 mM y EDTA 1 mM. La transferencia e hibridación del DNA, presente en los geles, con la sonda radiactiva pLS1 (actividad específica 5 x 10<sup>7</sup> cpm/ $\mu\text{g}$ ) se realizó según se describe en Sambrook y cols, (1989). Las bandas de las autorradiografías procedentes de los geles neutros y alcalinos se cuantificaron mediante densitometría.

### **Irradiación de cultivos celulares con luz UV y tratamiento con MMS**

Los cultivos de *S. pneumoniae* fueron crecidos a 37°C en AGCH a 5 x 10<sup>7</sup> UFC/ml. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en un volumen igual de KPO<sub>4</sub> 0,05 M pH 7,8, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 2,0 M, glucosa al 0,2%, albumina de suero bovino al 0,05% y 3 unidades de catalasa por ml. Los cultivos de *E. coli* fueron crecidos a 1 x 10<sup>8</sup> UFC/ml en medio mínimo a 37°C. 10 ml de los cultivos fueron irradiados en una placa petri (9,5 cm de diámetro) usando una lámpara bactericida que emite preferencialmente a 254 nm con una energía de 2,4 J/m<sup>2</sup> por seg. La viabilidad de *S. pneumoniae* y *E. coli* fue determinada mediante plaqueo en AGCH y TY, respectivamente.

Los cultivos de *E. coli* fueron crecidos a 37°C a 1 x 10<sup>8</sup> UFC/ml en medio. Las células fueron recogidas y resuspendidas en solución salina y MMS 25 mM, se extrajeron alícuotas a distintos tiempos. La viabilidad celular fue determinada mediante plaqueo en TY.

### **Análisis por ordenador**

Se han utilizado diversos programas de computador DNASTAR (Inc., UK). La comparación gráfica de las polimerasas y exonucleasas se realizó mediante el programa DOTPLOT. En los estudios de comparación de secuencias los alineamientos múltiples basados en alineamientos binarios fueron conseguidos mediante el programa ALING, basado en el algoritmo de Lipman y Pearson (1985). Estos alineamientos se mejoraron manualmente para obtener la máxima homología cruzada, manteniendo las relaciones de los aminoácidos presentes en la matriz STANDARD.PAN, que derivan de la comparación de proteínas relacionadas proximamente y determina la probabilidad de un cambio de un aminoácido por otro en un determinado período de tiempo. A continuación se muestra la matriz de similaridad de aminoácidos utilizada en las comparaciones de secuencias:

STANDARD.PAM

	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W	X
C	12,																				
S	0,	2,																			
T	-2,	1,	3,																		
P	-3,	1,	0,	6,																	
A	-2,	1,	1,	1,	2,																
G	-3,	1,	0,	-1,	1,	5,															
N	-4,	1,	0,	-1,	0,	0,	2,														
D	-5,	0,	0,	-1,	0,	1,	2,	4,													
E	-5,	0,	0,	-1,	0,	0,	1,	3,	4,												
Q	-5,	-1,	-1,	0,	0,	-1,	1,	2,	2,	4,											
H	-3,	-1,	-1,	0,	-1,	-2,	2,	1,	1,	3,	6,										
R	-4,	0,	-1,	0,	-2,	-3,	0,	-1,	-1,	1,	2,	6,									
K	-5,	0,	0,	-1,	-1,	-2,	1,	0,	0,	1,	0,	3,	5,								
M	-5,	-2,	-1,	-2,	-1,	-3,	-2,	-3,	-2,	-1,	-2,	0,	0,	6,							
O	-2,	-1,	0,	-2,	-1,	-3,	-2,	-2,	-2,	-2,	-2,	-2,	-2,	2,	5,						
L	-6,	-3,	-2,	-3,	-2,	-4,	-3,	-4,	-3,	-2,	-2,	-3,	-3,	4,	2,	6,					
V	-2,	-1,	0,	-1,	0,	-1,	-2,	-2,	-2,	-2,	-2,	-3,	-3,	4,	2,	6,					
F	-4,	-3,	-3,	-5,	-4,	-5,	-4,	-6,	-5,	-5,	-2,	-4,	-5,	0,	1,	2,	-1,	9,			
Y	0,	-3,	-3,	-5,	-3,	-5,	-2,	-4,	-4,	-4,	0,	-4,	-4,	-2,	-1,	-1,	-2,	7,	10,		
W	-8,	-2,	-5,	-6,	-6,	-7,	-4,	-7,	-7,	-5,	-3,	2,	-3,	-4,	-5,	-2,	-6,	0,	0,	17,	
X	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0

La superposición de los aminoácidos del dominio carboxilo terminal de Spn PolI sobre la estructura del fragmento Klenow fue realizada mediante el programa FRODO (Jones, 1978). Este programa permite la construcción de modelos a partir de la utilización de átomos guía y ángulos.

## **RESULTADOS**

## ESTRUCTURA Y EXPRESION DEL GEN *POLA* DE *S. PNEUMONIAE*

### Determinación de la secuencia de nucleótidos del gen *polA* de *S. pneumoniae*

En 1986, Martínez y cols, clonaron un fragmento de DNA cromosómico de neumococo de 4,2 kb en el vector plasmídico pLS1, dicho inserto cromosómico incluye el gen *polA* de *S. pneumoniae*. El plásmido recombinante obtenido se denominó pSM22 (Fig. 7). En este estudio determinamos la secuencia de nucleótidos del fragmento de 2,8 kb *DraI-EcoRI* del plásmido pSM22 que contiene el gen *polA*. La determinación de la secuencia de nucleótidos se realizó mediante la obtención de fragmentos de restricción del plásmido pSM22 marcados radiactivamente, en uno de los extremos de una de las hélices del DNA, y posterior tratamiento químico por el método de Maxam y Gilbert (1980). La estrategia de secuenciación, y la extensión de la secuencia obtenida a partir de cada fragmento están recogidos en la Fig. 7. La inspección de la secuencia de nucleótidos (Fig. 8) mostraba una posible secuencia promotora de la transcripción característica de los promotores procarióticos (Rosenberg y Court, 1979) compuesta por una región -10 TATAAT, secuencia idéntica a la consenso, y una región -35 aTGgtA que difiere en 3 nucleótidos de la secuencia consenso. En el extremo 3' del gen *polA* se observó una repetición inversa, conteniendo el codon de terminación de la traducción, capaz de generar una estructura de tipo tallo-lazo, característica de los terminadores procarióticos de transcripción rho independientes (Rosenberg y Court, 1979). La secuencia de aminoácidos, inferida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *polA*, mostraba un único marco de lectura abierto (ORF) de 892 codones. En la ORF se observaron dos posibles codones de iniciación de la traducción (AUG), el primero constituido por los tres primeros nucleótidos de la región -35 putativa, y el segundo localizado a 6 nucleótidos de la región -10 propuesta (Fig. 8).

### Determinación del inicio y fin del RNA transcrito del gen *polA*

El inicio del RNA transcrito del gen *polA* se determinó en *B. subtilis* MB11[pSM22], *S. pneumoniae* 708[pSM22] y *E. coli* C600[pSM31] (este plásmido contiene el inserto cromosómico de pSM22 clonado en el vector pLG339), mediante mapeo con la endonucleasa S1 (Berk y Sharp, 1977), siguiendo la estrategia descrita en la Fig. 9a. El RNA total de las distintas especies bacterianas se hibridó con un fragmento *AvaII-BstXI* (marcado radiactivamente en el extremo 5' generado por la digestión con *AvaII*), que contiene el extremo 5' del gen *polA*. Después del tratamiento con la endonucleasa S1, las muestras se analizaron en un gel de secuencia desnaturizante al 8% (Fig. 9b). La longitud de la hebra de DNA marcada, y protegida de la degradación, por el apareamiento con su RNA transcrito complementario, fue calculada por comparación con la migración de los fragmentos de DNA procedentes de las

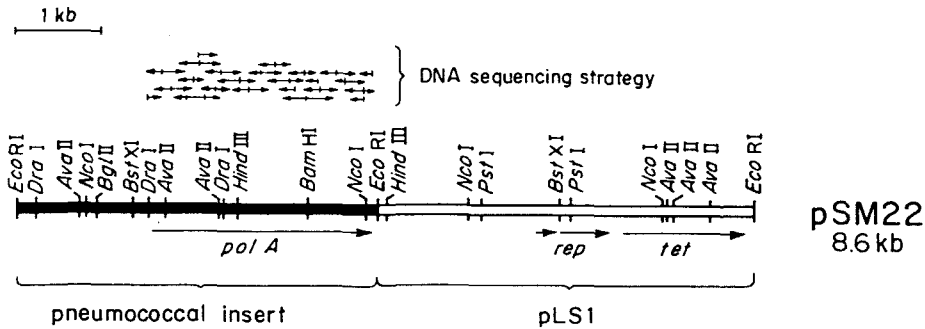


Fig. 7. Estrategia en la secuenciación del gen *polA* de *S. pneumoniae*. Mapa físico de pSM22. Símbolos genéticos: *rep*, codifican las proteínas de replicación del plásmido pLS1; *tet*, codifica una proteína que confiere resistencia a Tc; *polA*, codifica Spn Pol. Las flechas indican la dirección de transcripción de estos genes. Se indican únicamente los sitios de restricción empleados en la secuenciación del gen *polA*. En la parte superior se recoge la estrategia de secuenciación del gen *polA* (desde el sitio *DraI* a *EcoRI*), indicando con cada una de las flechas el inicio, dirección y longitud de la secuencia de cada uno de los fragmentos secuenciados por el método de Maxam y Gilbert (1980). Los segmentos respresentan: vector pLS1, segmento blanco; inserto cromosómico de 4,2 kb de *S. pneumoniae*, que contiene el gen *polA*, segmento negro.

-119  
5' -TTTAAATCTAGGTTTACTA -101

AATTCTCTGGCTCTATCTATTTATTTCGGAAAAAGTTTGAAAAACTTGCCTAGCTCTTCCCAATGGTATTTTTTATTCTTTCTTTATAATGGGTGT -1  
 ATGGATAAGAAAAAATTATTATTGATTGATGGGTCTTCTGTAGCTTTTTCGGCGTTTTTTCGCGCTGTATCAGCAGTTGGACCCTTTAAGAATCGCGCTG 100  
 GTTTCATACCAATCGGATTTATGGTTTTTCAGTTGATGTTGAGTCATTTTGTGGAGCGGTTTGAGCCGAGTCATATTTTGGTGGCTTTTGTATCGGGAAA 200  
 GACGACCTTCGGACAGAGATGTATCGGACTATAAGGGTGGTTCGGCCAAAGACTCCTGATGAGTTTCGTGAGCAATTTCTTTTCATTCTGAGTTCTGT 300  
 GATCATATGGGGATTCGTCACTATGAGCTGGCTCAGTATGAGCCGATGACATCATTGGGACCGTGGATAAGCTAGCAGAGCAGGATGGTTTTGATATTA 400  
 CCATTGTCAGTGGGGACAAGGATTTGATTTCAGCTGACGGATGAGCATACGGTGGTTGAAATTTCCAAGAAAGGTTGGCTGAGTTTGAAGCCCTTTACGCC 500  
 AGATTACCTCATGGAAGAAATGGGCCCTCACACCAGCTCAGTTTATCGATCTCAAAGCCGCTCATGGGTGATAAGCTGGGATAATATCCCTGGGGTACCCAAA 600  
 GTCGGTGAAGAGACGGGATTAAGCTCTTGTCTGGAGCATGGTTTCGCTTGAGGGGATTTATGAAAAATTTGATGGAAATGAAGACTTCTAAGATGAAGGAAA 700  
 ATCTCATCAATGACAAGGAACAGGCCCTTTTGTCTAAACACTAGCAGCCATTGATACCAAGCCACCGATTTCGATTTGATGAGGACTTGGTCTATAAG 800  
 TGGTCCAGATGTTGAAAACTTTGGGAAATTTCTACGATGAGATGGGCTTCAAACAGCTCAAAGCAGCTTTAAATATGTCGTCAGCTGATGTCGCTGAGGAT 900  
 TTGGATTTACTATTGTTGACCAAAATCAGTCAAGATATGCTGAGTGAAGAGTCTATCTTCCACTTTGAGCTTTTTGGTGAAGATTACCATACAGATAAT 1000  
 TGGTTGGATTTCCCTGGTCTTGTGGGATCAGCTCTATGCCACAGACAAGCTGAGCTTTGCAAGACCCGATTTTCAAAGATTCTTGAAGAAAAACATC 1100  
 TCTGAGGTTTTATGACTTTAAGAAAGTTAAAGTTTTTGAACGTTTTGGTGTAGATTTGCAAGCCCTCTTTTACATCCGTTTGGCTAAATACCTC 1200  
 CTTTCGACTGTGGAGACAATGAAATTCGACCACTCGCTAGCTTTTATGGTTCAGACTTACTTGGTTGATGATGAAACTTTCTACGGTAAAGGATTTAAAA 1300  
 AGGCCATTCTGAAACGTGAGAAATTTTGGAAACCTTAGCTTTGTAACCTTGCCTTTTTGGTGAAGAACAGGCTTATTTTACTTGAAGAACTCAGCGAAAA 1400  
 TGGCAATTAAGGCTTCTTTATGATATGGAGCAACCTCTGGCTTTTGTCTTGCCTTGCCTTGCCTTGCCTTGCCTTGCCTTGCCTTGCCTTGCCTTGCCT 1500  
 GAGATGCAGGCTGAAAAATGAGCTTGTCTATTGAAAAACTGACTCAAGAGATTACGAGCTGCTGATGAGGATTTAATGCAACTCCCTAAGCAAGTTGG 1600  
 GCGTCTTCTTTTGAAGAAATGGGACTTCTCTAGAATACACTAAGAAAAACCAAGACAGGTTATTCGACAGCAGTGGATTTTTGAGCCCTCTCCTCC 1700  
 TATTGCTCCGATTTGTAAGAAAACTCTGGATTACCGTCAAATTTGCTAAGATTCAACTACTTATGTAATTTGCTTTCAGGACTGGATTTTGGCTGATGGA 1800  
 AAGATTCTACTCGCTATGTGCAAGATTTGACCCAGACCGGGGCTTTTGTCTAGTGGATTCCAAATTTGCAAAATTTCTTCCCGATTGGAACAGGGCC 1900  
 GCTTGATTTCGAAAGGCTTTTGTCCAGAGTGGGAGGATAGTGTCTACTCAGCTTGCCTTATTCAGGATTTGAATTCGCGTTTTTGGCCATATTTCTAA 2000  
 GGATGAGCACTTGATTAAGGCCCTTCCAAGAGGGGCGAGATTCATACTTGCACAGCCATTCGCGGCTTTTGGCATTGAGCGCTCTGATAATGTGACTGCA 2100  
 AATGACCGTCGCAATGCCAAGGCAAGTTAACTTTGGAGTGGTTTATGGGATTTTCAGACTTTGGCTTGTCTAATAATTTGGGAAATTAATGCTGATAAGGAACTA 2200  
 AAGCCTACATTGATACCTACTTTGAACGTTTTCCAGGATTAAGAACTACATGGATGAAATGGTCCGGGAGGCGCGTGAATAAGGGCTATGTAAGACCCT 2300  
 CTTTAAAGCCTCGCCGAGATTTGCCAGATATCAATTCGCGCAACTTCAATATTCGTGGTTTTTCGAGGCAACTGCTATCAACTCACCTATCCAAGGATTCG 2400  
 GCAGCAGATATTCTCAAAGATTGCCATGATTCAGCTAGATAAAGCCTTGGTTGCAAGTGGTTATCAGACTAAGATGCTGTTACAAGTGCACGATGAAATCG 2500  
 TCCTTGAAGTGCCTAAATCTGAATTTGGTAGAGATGAAAAAATTTGGTGAAGCAAAACCATGGAAGAAAGCCATTCAACTCAGTGTCTCTTATCCAGATGA 2600  
 GAATGAAGGGGCAACCTGGTACGAGGCTAAATGAAAAAGGGGGCTAGTCCICCTIIIIITGATGAGAAATTC-3'

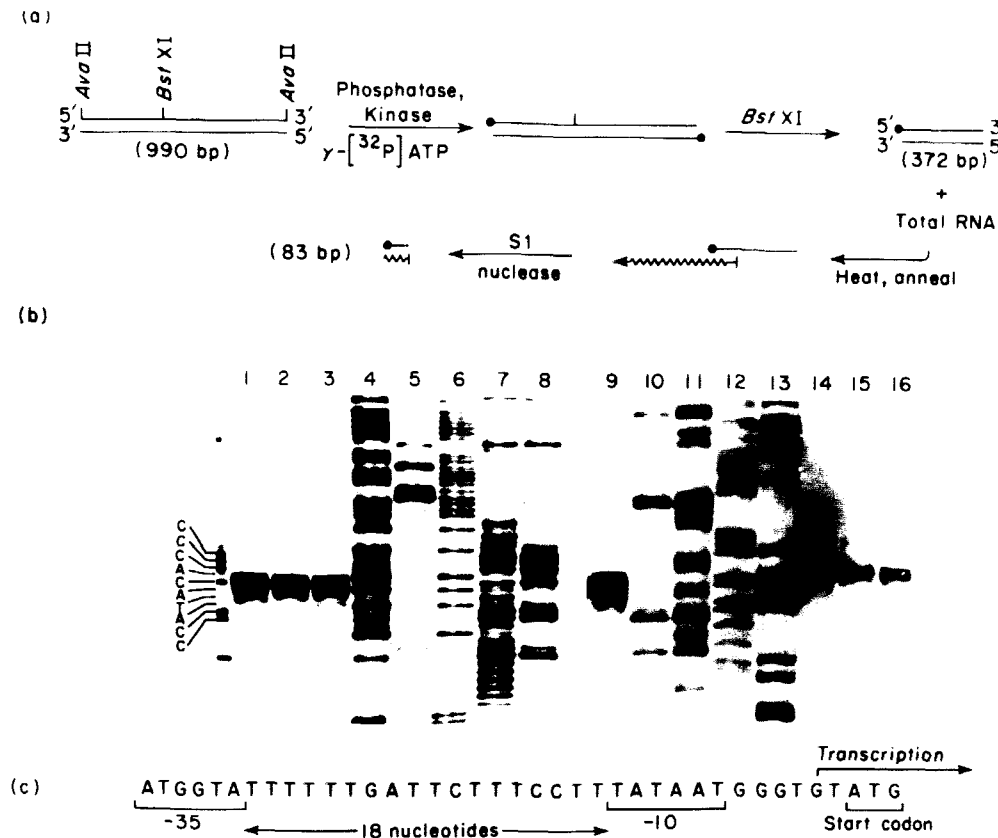
Fig. 8. Secuencia de nucleótidos del gen *polA*. Se muestra la hebra codificante. Los números positivos comienzan en el codon de iniciación de la traducción. Símbolos: subrayado continuo, secuencia del promotor de transcripción; subrayado discontinuo, secuencia del terminador; ---, codon de iniciación de la traducción; ---, codon de terminación de la traducción.

reacciones de secuencia del fragmento *AvaII-BstII*. En las tres estirpes bacterianas se observaron tres fragmentos protegidos con una longitud de 80 a 83 nt. El tamaño de los fragmentos se obtuvo sustrayendo un factor corrector de 1,5 nt, debido al retraso de migración de las bandas de DNA de las reacciones de secuencia obtenidas por rotura química, respecto a la migración de las muestras tratadas con la endonucleasa S1 (Fig. 9b, calles 1, 2 y 3). La aparición de varias bandas correspondientes al fragmento de DNA protegido es aparentemente debido a artefactos de la endonucleasa S1 (Sollner-Webb y Reeder, 1979). Se intentó determinar con mayor exactitud el sitio de inicio de la transcripción, disminuyendo la concentración de la endonucleasa S1 en el ensayo (50 U/ml). En estas condiciones se obtuvo principalmente un protegido de 83 nt con el RNA de las tres especies bacterianas analizadas (Fig. 9b, calles 14, 15 y 16). Estos resultados muestran que el sitio de iniciación del RNA transcrito del gen *polA* es único y corresponde a la guanina indicada en la Fig. 9c. Así mismo, en esta Fig. se muestra la secuencia de DNA del extremo 5' del gen *polA*, comprobándose que el sitio de inicio del RNA transcrito se encuentra precedido y a la distancia correcta de la secuencia promotora putativa. La determinación del inicio de la transcripción de este gen se distinguió por ser la primera identificación realizada en *S. pneumoniae* y reveló una región promotora similar a la consenso procariótica, como ya había sido sugerido por Stassi y cols, en 1982.

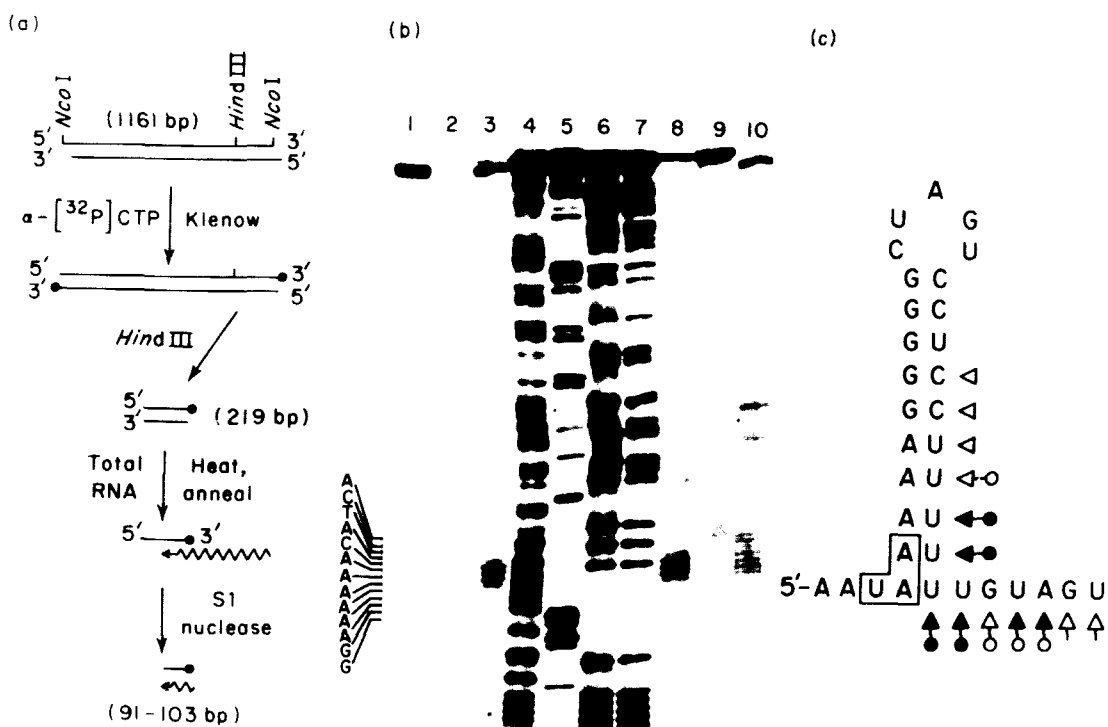
Para determinar el codon de iniciación de la traducción de Spn PolI en su sistema, la Dra. S. Martínez de Castro, purificó la proteína a homogeneidad a partir de cultivos bacterianos de *S. pneumoniae* 641[pSM22] según está descrito en López y cols, (1989). Mediante un secuenciador de fase gaseosa (Applied Biosystem) se estableció la secuencia amino-terminal de Spn PolI (Met-Asp-Lys-Lys-Lys-Leu-Leu-Leu-Ile-Asp), que es idéntica en sus 10 primeros aminoácidos a la inferida a partir de la secuencia de nucleótidos, comenzando la traducción en el segundo codon de iniciación de la ORF del gen *polA* (Fig. 9c). La iniciación de la traducción a partir de este codon generaría una proteína de masa molecular 99.487 Da.

Como consecuencia del análisis del inicio de la transcripción y traducción del gen *polA* situamos el codon de iniciación de Spn PolI a tan solo 2 nt del inicio del RNA transcrito.

Se determinó el extremo 3' del RNA mensajero del gen *polA* por mapeo con endonucleasa S1. En la Fig. 10a podemos observar un esquema de las distintas etapas del ensayo. La determinación se realizó con RNA total de *S. pneumoniae* 708[pSM22], *B. subtilis* MB11[pSM22] y *E. coli* C600[pSM31], (Fig. 10b, calles 8, 9 y 10), y RNA total procedente de las mismas estirpes conteniendo plásmidos sin el locus *polA* (pJS3, pC194 y pLS1) (Fig. 10b, calles 1, 2 y 3). En *S. pneumoniae* [pSM22] (Fig. 10b, calle 8) se observan 4 bandas preferentes y 4 minoritarias, que localizan el sitio de terminación del mRNA en el extremo 3' de una probable estructura tipo tallo-lazo del mRNA (indicado en la Fig. 8 y 10c), seguida de un grupo de residuos U, típico de los terminadores transcripcionales (Rosenberg y Court, 1979). Idénticos resultados se obtuvieron en *B. subtilis* [pSM22] (Fig. 10b, calle 9) y *E. coli* [pSM31] (Fig. 10b, calle 10), aunque este último mostraba un patrón de bandas más heterogéneo. Se



**Fig. 9. Localización del extremo 5' del transcrito del gen *polA* en *S. pneumoniae*, *B. subtilis* y *E. coli*.**  
 (a) Estrategia utilizada para la determinación del sitio de inicio de la transcripción del gen *polA*. Símbolos: círculos negros, marca radiactiva del extremo 5'P; línea ondulada, RNA transcrito. (b) Gel de electroforesis desnaturizante, al 8% de PAA, de los fragmentos de DNA protegidos de la degradación por tratamiento con la endonucleasa S1. Calles 1-3, fragmentos de DNA protegidos de la degradación por endonucleasa S1 (100 U/ml) mediante hibridación con RNA total de *E. coli* C600[pSM31], *B. subtilis* MB11[pSM22], *S. pneumoniae* 708[pSM22], respectivamente. Calles 4-8, reacciones de secuencia de DNA del fragmento *AvaII-BstXI*: 4, A+C; 5, G; 6, A+G; 7, T+C; 8, C. Calle 9, igual a calle 3. Calles 10-13, reacciones de secuencia de DNA de un fragmento de referencia no relacionado: 10, G; 11, G+A; 12, T+C; 13, C. Calles 14-16, fragmentos de DNA protegidos de la degradación por endonucleasa S1 (50 U/ml) mediante hibridación con RNA total de *E. coli* C600[pSM31], *B. subtilis* MB11[pSM22], *S. pneumoniae* 708[pSM22], respectivamente. (c) Secuencia de DNA del promotor de transcripción, sitio de inicio de la transcripción y codón de iniciación de la traducción.



**Fig. 10. Localización del extremo 3' del transcrito del gen *polA* en *S. pneumoniae*, *B. subtilis* y *E. coli*.** (a) Estrategia utilizada en la determinación del sitio de terminación de la transcripción del gen *polA*. Símbolos: círculos negros, marca radiactiva del extremo 3'-[<sup>32</sup>P]dCMP; línea ondulada, RNA transcrito. (b) Gel de electroforesis desnaturalizante al 8% de PAA, de los fragmentos de DNA protegidos de la degradación por tratamiento con endonucleasa S1. Calles 1-3, fragmentos de DNA protegidos de la degradación por endonucleasa S1 (100 U/ml) mediante hibridación con RNA total *E. coli* C600[pJS3], *B. subtilis* MB11[pC194], *S. pneumoniae* 708[pLS1], respectivamente. Calles 4-7, reacciones de secuencia de DNA del fragmento *NcoI-HindIII*: 4, A+C; 5, G; 6, T+C; 7, C. Calles 8-10, fragmentos de DNA protegidos de la degradación por endonucleasa S1 (100 U/ml) mediante hibridación con RNA total de *S. pneumoniae* 708[pSM22], *B. subtilis* MB11[pSM22] y *E. coli* C600[pSM31], respectivamente. (c) Secuencia de DNA del terminador de transcripción y sitios de terminación del RNA transcrito. Símbolos: negros, sitios principales de terminación; blancos, sitios minoritarios de terminación; círculos, *S. pneumoniae*; triángulos, *E. coli*; guión, *B. subtilis*; bloque, codon de terminación de la traducción.



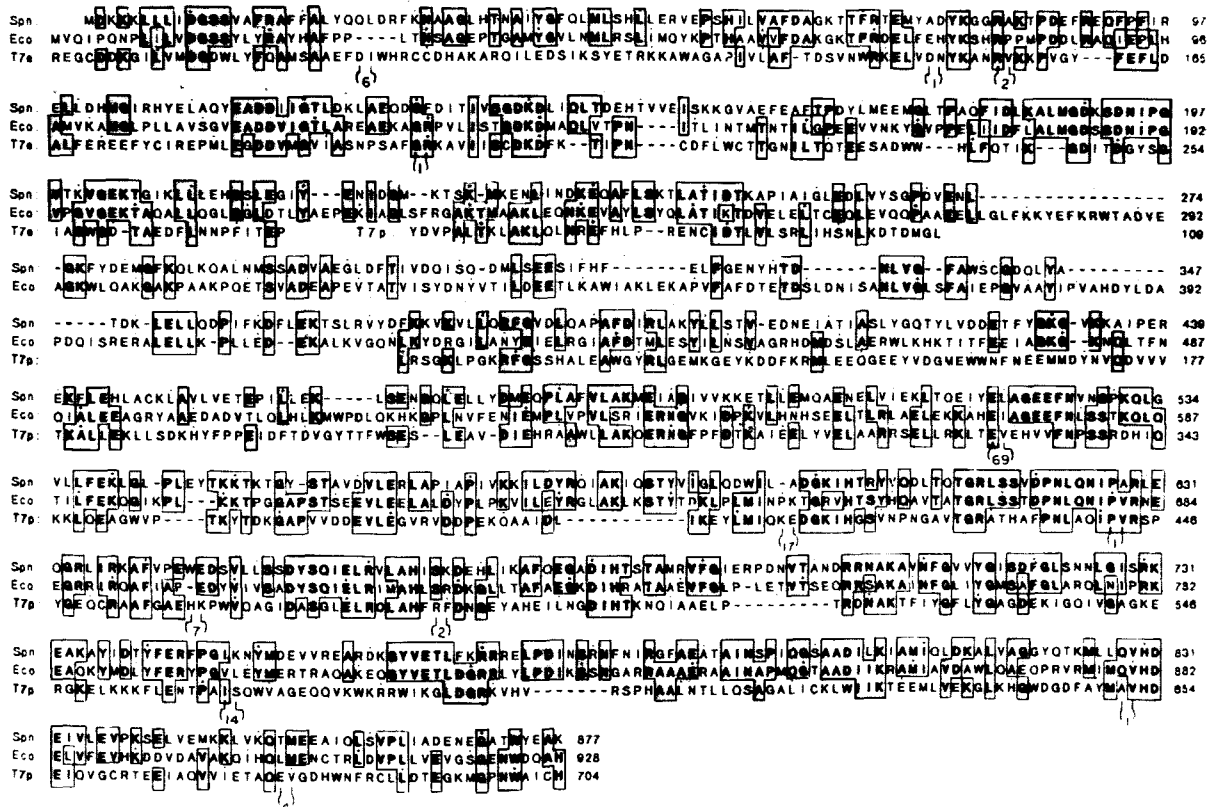
calculó la eficiencia de terminación teórica del terminador del gen *polA* aplicando los parámetros y algoritmos descritos por d'Aubenton y cols, (1990) para terminadores transcripcionales de *E. coli*. La estructura tallo-lazo del RNA transcrito del gen *polA* debería provocar la disociación de la RNA polimerasa de *E. coli* en un 70% de los mRNA. Como esperabamos, no se observó ningún fragmento de DNA protegido cuando la hibridación se realizó con RNAs procedentes de *E. coli* [pJS3] y *B. subtilis* [pC194] (Fig 10b, calles 1 y 2). En la hibridación realizada con RNA de *S. pneumoniae* [pLS1] observamos un patrón de bandas similar al obtenido con el RNA de la estirpe neumocócica con el plásmido pSM22 (Fig. 10b, calle 3). Este resultado muestra una protección idéntica del fragmento de DNA en ambas estirpes, con independencia del número de copias presentes del gen *polA*.

### COMPARACION DE SPN POLI CON LA DNA POLIMERASA I DE E. COLI Y LA POLIMERASA Y EXONUCLEASA DEL FAGO T7

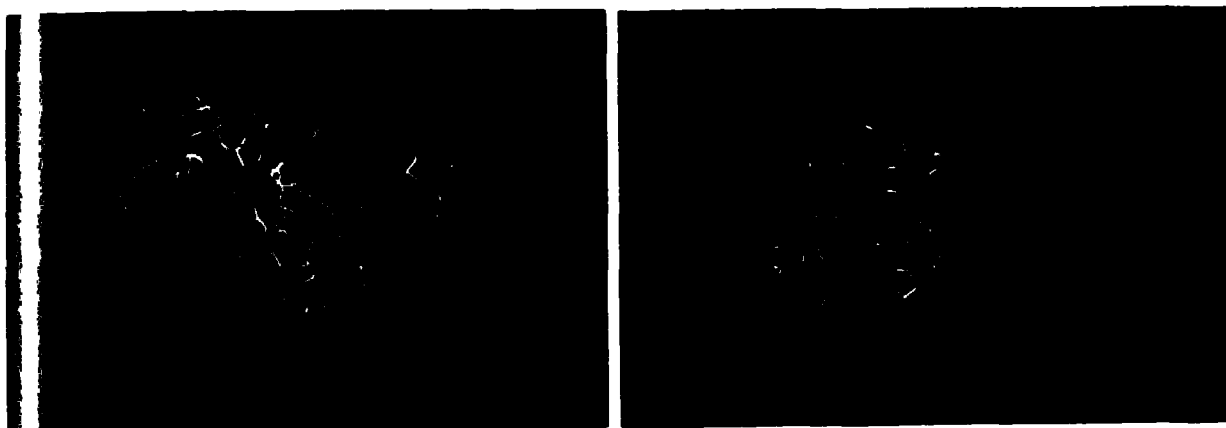
La secuencia de aminoácidos de Spn PolI se comparó con la DNA polimerasa I de *E. coli*, la DNA polimerasa y exonucleasa del colifago T7. En la Fig. 11 se pueden observar los bloques de aminoácidos idénticos que poseen las tres polimerasas y la exonucleasa de T7. Esta comparación mostraba un 40% de residuos idénticos entre Spn PolI y Eco PolI, situados generalmente dentro de bloques conservados. El grado de homología entre estas dos polimerasas variaba en función de las regiones alineadas. Si dividimos Spn PolI en tres regiones, residuos 1-304, 305-468 y 469-877, en función de la disposición de los tres dominios enzimáticos de Eco PolI (Brown y cols, 1982; Ollis y cols, 1985a; Freemont y cols, 1986), la identidad fue de un 36% en el extremo amino, un 49% en el extremo carboxilo, y por último, en la región central, un 28%. En esta zona intermedia de Spn PolI, de menor identidad con Eco PolI, se situarían varios "gaps", que permiten el perfecto alineamiento de la mitad carboxilo de las proteínas. En esta región está localizado el dominio con actividad exonucleásica 3'→5' de Eco PolI.

La DNA polimerasa del colifago T7 había sido comparada previamente con Eco PolI por Ollis y cols, (1985b). En nuestra alineamiento (Fig. 11) mejoramos la disposición de los bloques de homología conservados debido a la inclusión de Spn PolI en la comparación. Así mismo, se equiparó la exonucleasa 5'→3' del fago T7 con la región amino de las polimerasas bacterianas. Esta homología entre nucleasas bacterianas y fágicas no había sido detectada previamente.

Finalmente, realizamos la superposición de aminoácidos de los dos tercios del extremo carboxilo de Spn PolI sobre la estructura tridimensional del fragmento Klenow determinada por Ollis y cols, 1985a. La proyección de los residuos se realizó con el sistema de representación gráfica Evans y Sutherland PS300, utilizando el programa FRODO (Jones, 1978). Este programa permite visualizar la probable estructura que adquiere la región carboxilo de Spn PolI (Fig. 12). La mayoría de los aminoácidos idénticos están situados en el interior de la hendidura



**Fig. 11. Comparación de las DNA polimerasas I de *S. pneumoniae* y *E. coli*, DNA polimerasa y exonucleasa del bacteriófago T7.** Spn, DNA polimerasa I de *S. pneumoniae*; Eco, DNA polimerasa I de *E. coli*; T7a, proteína codificada por el gen 6 del fago T7; T7p, proteína codificada por el gen 5 del fago T7. Se muestra de izquierda a derecha y de arriba a abajo la secuencia de aminoácidos de las proteínas desde el extremo amino al extremo carboxilo terminales. Únicamente está recogida íntegramente la secuencia de aminoácidos de Spn y Eco. Se indican los números de los residuos situados a la derecha de cada una de las líneas. Los puntos de la parte superior están situados cada 10 residuos. Los guiones representan la ausencia de los residuos correspondientes. Los números insertados en las secuencias de las proteínas de T7, indican residuos no mostrados en la comparación. Los bloques sombreados muestran aminoácidos idénticos.

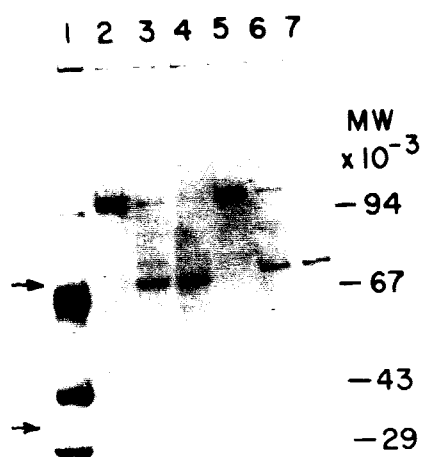


**Fig. 12.** Aminoácidos comunes de PolI de *S. pneumoniae* y *E. coli* mostrados en la estructura tridimensional del fragmento Klenow de *E. coli*. Se muestran dos perspectivas de la estructura del fragmento Klenow determinada por Ollis y cols, (1985a). Los carbonos- $\alpha$  coordinados de la estructura han sido tomados del banco de datos de proteínas de Brookhaven y representados en un sistema gráfico, Evans y Sutherland PS300 utilizando el programa FRODO (Jones, 1978). En estas representaciones el DNA sustrato está localizado en la hendidura de la estructura, con el eje de la doble hélice perpendicular al plano de la Fig. Código de colores: amarillo-verde, residuos idénticos en Spn PolI; rojo-naranja, residuos diferentes en Spn PolI; azul-blanco, residuos ausentes en Spn PolI.

de la estructura tridimensional del fragmento Klenow, implicada en la unión al DNA sustrato durante la polimerización, localizándose en el exterior los residuos no conservados. El cristal del fragmento Klenow (Ollis y cols, 1985a) presenta un dominio desordenado que ha sido estructurado recientemente en el cocristal del fragmento Klenow con DNA sustrato (Beese y cols, 1992). En el cocristal este dominio desordenado se pliega y se sitúa cerrando la hendidura donde se introduce el DNA sustrato. Este dominio desordenado está localizado entre los residuos 574-622 de Eco PolI que presenta un 59% de identidad con los residuos 521-570 de Spn PolI (Fig. 11). Por último, Spn PolI carece de ciertos grupos de aminoácidos que se concentran en el extremo amino terminal del fragmento Klenow pertenecientes al dominio de actividad exonucleasa 3'→5' (Fig. 12).

### PROTEOLISIS DE LA DNA POLIMERASA I DE *S. PNEUMONIAE*

La DNA polimerasa I de *E. coli* posee un sitio sensible a proteasas. La subtilisina genera dos productos de proteolisis de una masa molecular aproximada de 70 y 35 kDa (Klenow y Henningsen, 1970 ; Brutlag y cols, 1969). Era probable que dada la conservación de aminoácidos en Spn PolI respecto Eco PolI (Fig. 11), principalmente en los extremos amino y carboxilo terminales, Spn PolI mantuviera un sitio sensible a proteasas. En la Fig. 13 podemos observar los dos polipéptidos generados por el tratamiento de Spn PolI (con una pureza superior al 90%) con subtilisina (Fig. 13, calles 2-4). Estos derivados migran ligeramente más rápidos que los productos proteolíticos de Eco PolI, debido al menor tamaño de Spn PolI (Fig. 13, calles 5-7). En la izquierda de la Fig. 13 indicamos con unas flechas los productos proteolíticos de Spn PolI que se corresponden con un tamaño aproximado de 67 y 32 kDa. Este experimento mostró que Spn PolI posee un sitio específico de proteolisis semejante a Eco PolI, además como mostramos en la Fig. 11, existía una region de homología entre los residuos Gly<sub>294</sub> - Glu<sub>337</sub> de Eco PolI y Gly<sub>275</sub> - Glu<sub>317</sub> de Spn PolI, el sitio sensible a proteasas de Eco PolI (Thr<sub>323</sub>-Val<sub>324</sub>) está incluido en esta región, y es bastante probable que el sitio de proteolisis de Spn PolI esté localizado entre los residuos Thr<sub>304</sub>-Ile<sub>305</sub>. Estos datos junto a la moderada similitud de secuencia de Spn PolI y Eco PolI nos permiten sugerir la existencia de dos dominios estructurales separados y una estructura tridimensional en Spn PolI próxima a Eco PolI (Ruscitti y cols, 1992).



**Fig. 13. Proteolisis de Spn PolI.** Calle 1, mezcla de proteínas estándar, cuyas masas moleculares (en Da) están indicadas a la derecha. Calle 2 y 5, 1  $\mu$ g de Spn PolI y Eco PolI sin tratar. Calles 3 y 4, 1  $\mu$ g de Spn PolI tratada con 0,2 ng y 0,5 ng de subtilisina. Calles 6 y 7, 1  $\mu$ g de Eco PolI tratada con 0,2 ng y 0,5 ng de subtilisina. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE, al 5-15% de PAA. El gel fue teñido con azul brillante de Coomassie.

## CONSTRUCCION DE DERIVADOS DEL GEN *POLA* DE *S. PNEUMONIAE* Y CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LOS POLIPEPTIDOS CODIFICADOS

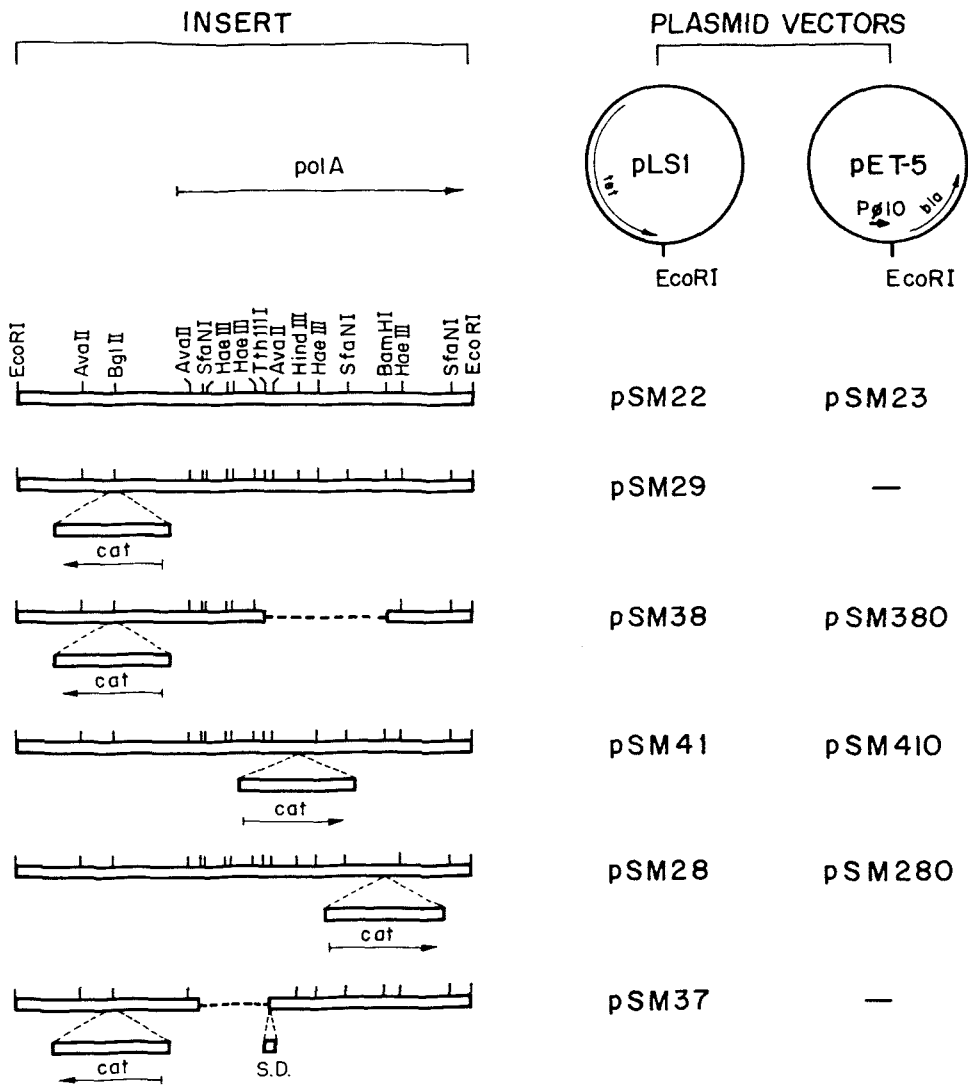
### Contrucción de derivados del gen *polA* por delección, mutagénesis insercional y fusión génica

La homología en la secuencia de aminoácidos de las DNA polimerasas I de *E. coli* y *S. pneumoniae* permitía predecir la localización de los dominios de actividad exonucleásica y polimerásica en los extremos amino y carboxilo de Spn PolI, respectivamente. Para confirmar esta hipótesis se truncó el gen *polA* neumocócico a diferentes distancias del extremo 5'. Los plásmidos derivados pSM28, pSM38 y pSM41 podrían expresar distintos productos génicos con actividad nucleásica. Por otra parte se construyó el plásmido pSM37, que contiene una delección en el extremo 5' del gen *polA*, una inserción del SD del gen 10 del bacteriófago T7 y una fusión génica entre el extremo carboxilo de Spn PolI y los 11 primeros codones del gen 10 de T7. Todos los genes *polA* mutantes contienen el promotor del gen silvestre. Los plásmidos derivados codifican también para el enzima CAT, utilizada como control interno de actividad enzimática. Por último el inserto cromosómico de los plásmidos derivados posee suficiente homología con el cromosoma para permitir la posterior integración de las mutaciones en el DNA cromosómico.

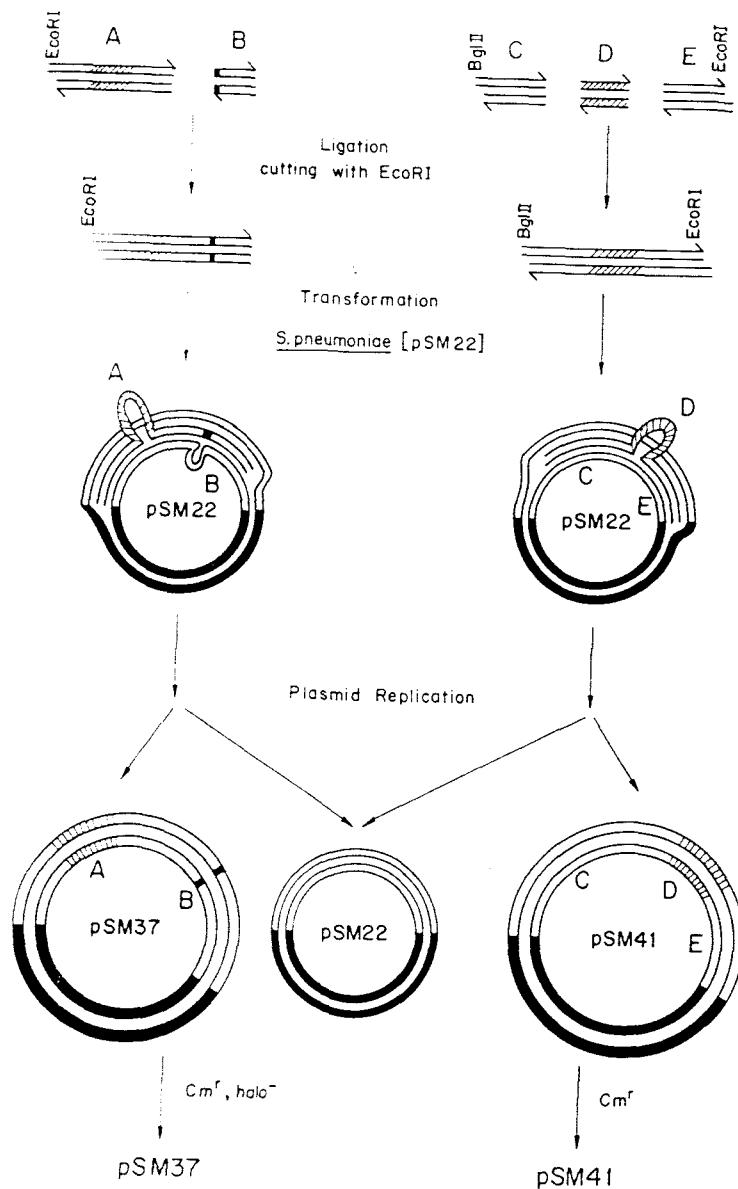
El plásmido pSM28 fue construido por inserción del fragmento *MboI* de 1,14 kb de pJS3 (derivado del plásmido estafilococal pC194) (Ballester y cols, 1986), en el sitio único *BamHI* de pSM22 (coordinada 1861 del gen *polA*). El fragmento *MboI* contiene el gen *cat* de pC194 bajo el control de su propio promotor y del promotor del gen *tet-L* del plásmido pLS1 (Lacks y cols, 1986). La presencia de estos dos promotores permite la expresión del enzima Cloramfenicol acetil transferasa (CAT), codificada por el gen *cat*, en *S. pneumoniae* (Ballester y cols, 1990). El gen alterado resultante en pSM28 se denominó *polA* $\Omega$ (1861bp::*cat*) (Fig. 14).

En el plásmido pSM38 se eliminó la parte central del gen *polA*, conservándose los 791 y 769 nt de los extremo 5' y 3' del gen *polA*. En la construcción de pSM38 se utilizó el plásmido pSM29, derivado de pSM22 mediante inserción del gen *cat* en el sitio único *BglII* del plásmido, situado delante del gen *polA* silvestre (Martínez y cols, 1987). Dicho plásmido se digirió con *Tth1111* y *BamHI* (coordinadas 791 y 1861 del gen *polA*), los extremos cohesivos generados por los enzimas de restricción se rellenaron con *Eco* PolIK y se circularizó el fragmento de 8,7 kb por ligación. El gen mutante se denominó *polA* $\Delta$ (791-1861bp) (Fig. 14).

La obtención del plásmido pSM41 se realizó por un mecanismo genético denominado transformación plasmídica (Contente y Dubnau, 1979; Lacks y cols, 1982). Este mecanismo permite la introducción de nueva información genética, contenida en una molécula donadora de DNA lineal, en un plásmido receptor mediante recombinación. El DNA donador posee un marcador de resistencia antibiótica situado entre dos regiones homólogas al plásmido residente. En la parte derecha de la Fig. 15 se especifican las etapas de la construcción del plásmido



**Fig. 14. Mapas físicos de los insertos cromosómicos de plásmidos que contienen genes *polA* silvestres o mutantes.** Los genes son transcritos en las direcciones indicadas por las flechas. Símbolos genéticos: *polA*, codifica Spn Poll; *tet*, codifica una proteína que confiere resistencia a Tc, y *cat*, codifica el enzima CAT. S.D. sitio de unión a los ribosomas para la traducción del gen 10 de T7; P<sub>g10</sub>, promotor de transcripción del gen 10 de T7. Las deleciones dentro del gen *polA* son representadas por líneas discontinuas. Se señalan unicamente los sitios de restricción utilizados en las distintas construcciones. A la derecha se indica el nombre de los plásmidos obtenidos por la introducción de los insertos cromosómicos en los vectores pLS1 y pET-5.



**Fig. 15. Construcción de los plásmidos pSM37 y pSM41.** En la parte superior, se muestran los fragmentos de DNA utilizados en las construcciones (A, B, C, D, E); en la parte intermedia, una de las moléculas de DNA, generada por ligación con T4 DNA ligasa de los fragmentos y posterior digestión con *EcoRI*, requeridas para la introducción del *cat* mediante recombinación en el plásmido residente pSM22 durante la transformación plasmídica; y en la parte inferior, los plásmidos presentes en los transformantes seleccionados. Hemos de resaltar que los transformantes además del plásmido pSM37 ó pSM41 contenían pSM22, y fue necesario una nueva transformación para conseguir estirpes de *S. pneumoniae* con un contenido plasmídico homogéneo. Segmento rayado, gen *cat*; rectángulo negro, secuencia del gen 10 de T7 que contiene el sitio de unión a los ribosomas y los 11 primeros codones de dicho gen; segmento blanco, inserto cromosómico que incluye el gen *polA*; segmento negro, vector pLS1.



pSM41. Primeramente, la digestión de pSM22 con *Hind*III generó dos fragmentos con extremos protuberantes 5', estos extremos se convirtieron en romos por tratamiento con Eco PolIK. A continuación, los dos fragmentos *Hind*III se digirieron con *Bgl*II y *Eco*RI. Se purificaron los fragmentos *Bgl*II-*Hind*III de 1,65 kb y *Hind*III-*Eco*RI de 1,61 kb (fragmentos C y E en la Fig. 15). Por otra parte, el plásmido pJS3 fue digerido con *Mbo*I (coordenadas 2621 y 3761 de pJS3), se rellenaron los extremos cohesivos generados y se purificó el fragmento *Mbo*I-*Mbo*I de 1,14 kb (fragmento D en la Fig. 15). Los fragmentos C, D y E fueron ligados con T4 DNA ligasa. La mezcla de ligación fue digerida con *Eco*RI, para eliminar moléculas de DNA circulares, y este DNA se utilizó para transformar la estirpe *S. pneumoniae* 641[pSM22]. La homología conferida por los fragmentos C y E, permitió la introducción del gen *cat* de pJS3 en el sitio *Hind*III del gen *polA* (coordenada 1052) del plásmido residente pSM22. El gen *polA* del plásmido pSM41 se denominó *polA*Δ(1052bp::cat) (Fig. 14).

En la construcción del plásmido pSM37 se utilizó el mismo mecanismo genético de recombinación descrito en el párrafo anterior. En la parte izquierda de la Fig. 15, se detallan las etapas de la construcción. El plásmido pSM29 fue digerido con *Sfa*NI, los fragmentos obtenidos con extremos protuberantes 5', fueron tratados con Eco PolIK, y posteriormente digeridos con *Eco*RI. Se purificó un fragmento de 2,82 kb, que contiene el gen *cat* de pJS3, el promotor y 184 nt del extremo 5' del gen *polA* (fragmento A de la Fig. 15). El fragmento B se obtuvo por digestión con *Xba*I del plásmido pSM10 (Pons y cols, 1991). Los fragmentos generados se rellenaron con Eco PolIK y se purificó un fragmento de 920 pb, que contenía el sitio de unión a los ribosomas y los 11 primeros codones del gen 10 de T7 en fase con el gen *polA* de neumococo, desde su coordenada 805 hasta la posición 1639. A continuación, se ligaron los fragmentos A y B (Fig. 15), se trató la mezcla de ligación con *Eco*RI, y se transformó con este DNA la estirpe *S. pneumoniae* 641[pSM22]. Los transformantes se seleccionaron por resistencia a Cm y ausencia de halo de degradación de DNA alrededor de las colonias. El fenotipo nucleasa<sup>-</sup> o la falta de halo de los transformantes es consecuencia de la deleción de una región del extremo 5' del gen *polA* que anula la actividad nucleásica del producto génico codificado. Posteriormente, se analizó el contenido plasmídico de los transformantes, observándose el plásmido esperado de 9,2 kb, denominado pSM37, que contiene el gen *polA*Δ(184-805bp)Ω(184bp::pET-3b'[591-511bp]) (Fig. 14).

Los fragmentos *Eco*RI que contienen los genes *polA* mutantes presentes en los plásmidos pSM38, pSM41 y pSM28 fueron subclonados en el sitio *Eco*RI del vector de expresión pET-5 (Rosenberg y cols, 1987) de *E. coli*. Los plásmidos resultantes con las inserciones en la orientación correcta para su expresión se denominaron pSM380, pSM410 y pSM280 (Fig. 14).

Las inserciones o deleciones de los plásmidos pSM380, pSM41, pSM28 y pSM37 fueron analizadas mediante secuenciación de DNA por el método de Sanger y cols, (1977). En todos los plásmidos las secuencias obtenidas fueron las esperadas y los genes *polA* mutantes presentes en dichos plásmidos deberían codificar para los polipéptidos indicados en la Fig. 16.

```

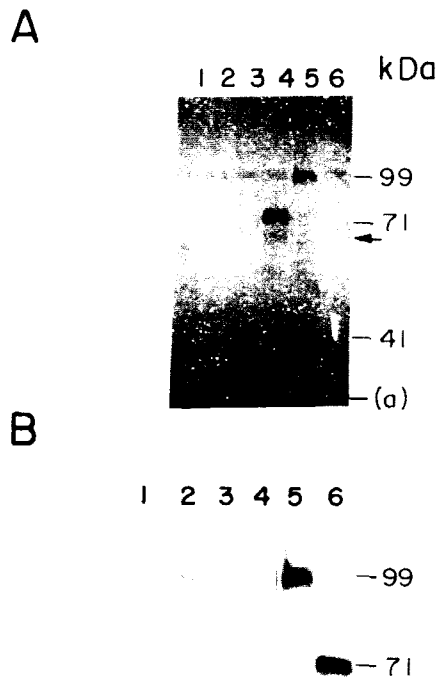
11
Mln264 1 MDKK ... APIAIGLEDLVYSGPDVENLGKIFYD 279 ... ATDKLELLQTPIFKD 361 ... LVDDETFYGKGVKKAIPEREK 451 ..... RLSSVDPNLQNIP 627 ... WYEAK 877
Mln351a 1 MDKK ... APIAIGLEDLIQTCKIFLTDWNRGA 279
Mln620 1 MDKK ..... ATDKLIFVKTTESKE 361
Mln269 1 MDKK ..... RLSSVDCENYRK 627
1 MASHTGGGQMORDRPDVENLGKIFYD..... WYEAK 623
    
```

**Fig. 16. Secuencia de aminoácidos de Spn Poll y sus derivados.** Se indican únicamente las secuencias de aminoácidos (inferidas de la secuencia de DNA) de los extremos amino y carboxilo, y las regiones de fusión de cada uno de los polipéptidos derivados de Spn Poll. Situamos en la parte superior los aminoácidos de Spn Poll silvestre presentes en cada una de las regiones. Los números indican las posiciones de los aminoácidos relativos al extremo N-terminal de cada una de las DNA polimerasas. Los aminoácidos anormales presentes en los polipéptidos Spn Poll alterados son indicados en negrita. Las líneas de puntos señalan los residuos idénticos entre las proteínas alineadas.

### Identificación de las actividades enzimáticas presentes en los polipéptidos derivados de la DNA Polimerasa I de *S. pneumoniae* en SDS-PAGE

Extractos crudos de la estirpe *S. pneumoniae* 641 con diferentes plásmidos fueron fraccionados en SDS-PAGE con DNA en la matriz. Estos geles fueron desarrollados para revelar *in situ* actividad nucleásica (Fig. 17A) o polimerásica (Fig. 17B). En todos los extractos se observó una banda tenue de degradación de DNA a la posición de 99 kDa (Fig. 17A), correspondiente al enzima Spn PolI codificada por el gen *polA* cromosómico. Esta banda fue más intensa en el extracto de la estirpe *S. pneumoniae* 641[pSM29] (Fig. 17A, calle 5) debido a la presencia en el plásmido pSM29 del gen *polA* en multicopia. Dos nuevas bandas se observaron en los extractos de *S. pneumoniae* 641[pSM41] y [pSM28], estos plásmidos codificaban unos polipéptidos con actividad nucleásica de 41 kDa y 71 kDa de masa molecular, respectivamente (Fig. 17A, calles 3 y 4). Estos polipéptidos detectados migraban electroforéticamente a las posiciones esperadas para los productos de los genes *polA* mutantes. Los extractos de *S. pneumoniae* 641[pSM38] y [pSM37] (Fig. 17A, calles 2 y 6) no presentaban ninguna banda extra con actividad nucleásica respecto a la estirpe sin plásmido (Fig. 17A, calle 1). Estos resultados permiten inferir que únicamente los polipéptidos codificados por los genes *polA* de los plásmidos pSM29, pSM28 y pSM41, poseen actividad nucleásica. En todos los extractos se observa un polipéptido con actividad nucleásica de aproximadamente 32 kDa (especificado como (a) en la parte de la derecha de la Fig. 17A). Este polipéptido posee mayor actividad nucleásica en los extractos de las estirpes *S. pneumoniae* 641 con los plásmidos pSM41, pSM28 y pSM29, debido a la presencia en estos plásmidos del gen *polA* en multicopia (Fig. 17A, calles 3-5). Dicho polipéptido coincide en tamaño con el producto pequeño de proteólisis generado por el tratamiento de Spn PolI con subtilisina (véase Fig. 13, calles 3 y 4). Además se observó otro derivado de Spn PolI (indicado con una flecha en la parte derecha de la Fig. 17A) revelado principalmente en el extracto de la estirpe 641[pSM28] (Fig. 17A, calle 4) que fue detectado también en la purificación de Spn PolIn620 (véase Fig. 3A y B).

La detección *in situ* de la actividad polimerásica de Spn PolI y sus derivados (Fig. 17B), mostró la presencia de una proteína de 99 kDa en todos los extractos analizados (Fig. 17B, calles 1-6). Dicho polipéptido es codificado por el gen *polA* cromosómico. En el extracto correspondiente a pSM29 (Fig. 17B, calle 5), destacaba la banda de actividad polimerásica en la posición de 99 kDa, como consecuencia de un mayor número de copias del gen *polA*. En el extracto de la estirpe con el plásmido pSM37, además del polipéptido de 99 kDa, se observó un nuevo polipéptido a la posición de 71 kDa (Fig. 17B, calle 6), codificado por el gen *polA* mutante presente en dicho plásmido. Así mismo se detectó una banda que migraba más lentamente que Spn PolI (a la posición de 120 kDa) con igual intensidad en todos los extractos, y por consiguiente, su expresión era independiente del gen *polA* silvestre. Probablemente, esta última proteína con actividad polimerásica es codificada por algún otro gen cromosómico



**Fig. 17. Detección *in situ* de las actividades nucleásica (A) y polimerásica (B) de los polipéptidos Spn Poll silvestre y mutantes.** Se separaron 50  $\mu\text{g}$  de proteínas de extractos celulares en SDS-PAGE al 10% de PAA con DNA en la matriz no activado (A) o tratado con DNasaI (B). Después de la electroforesis y eliminación del SDS, el gel fue desarrollado para detectar actividad nucleásica (A) o actividad polimerásica (B) como se indica en el apartado de Métodos. Se detectaron las actividades enzimáticas de los extractos celulares preparados a partir de las estirpes *S. pneumoniae* 641 sin plásmido (calle 1), o con los plásmidos pSM38, pSM41, pSM28, pSM29 y pSM37 (calles 2-6, respectivamente). Los tamaños de los productos codificados por los genes *polA* son indicados a la derecha. (a) es el producto de menor tamaño, con actividad nucleásica, generado por la proteólisis de Spn Poll. La flecha indica otro de los productos de proteólisis generado principalmente a partir del polipéptido de 71 kDa con actividad nucleásica (calle 4).

diferente al gen *polA*.

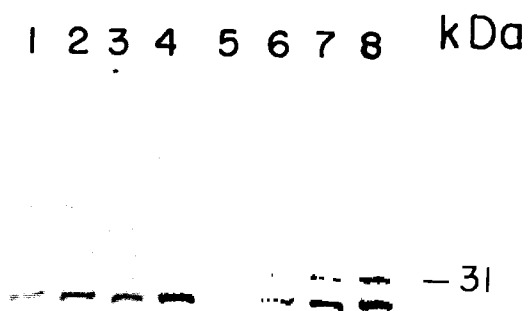
El polipéptido mutante codificado por el plásmido pSM38 no fue observado en ninguno de los geles de detección enzimática (Fig. 17A y B). Este hecho podría ser debido a la carencia de actividad o la ausencia de síntesis del polipéptido. Para confirmar la primera hipótesis cultivos de células de la estirpe *E. coli* BL21(DE3)[pSM380] fueron inducidos con IPTG, lisados y el extracto resultante fraccionado en SDS-PAGE. En los extractos de la estirpe con el plásmido pSM380 se detectó una nueva proteína con una movilidad electroforética correspondiente a 31 kDa (Fig. 18, calles 5-8), no presente en el extracto de *E. coli* BL21DE3[pET-5] (Fig. 18, calles 1-4). Se analizó la actividad nucleásica de estos extractos en ensayos de actividad *in vitro* y detección *in situ* en SDS-PAGE con DNA en la matriz (datos no mostrados), no observándose ningún incremento de la actividad nucleásica en estos extractos, ni tampoco asociada a este polipéptido.

La detección *in situ* del polipéptido codificado por el gen *polA* mutante del plásmido pSM41 nos permitió delimitar el dominio con actividad exonucleásica entre los residuos 1 y 351 de Spn PolII, de la misma forma el plásmido pSM37 localizó el dominio con actividad polimerásica entre los residuos 269 y 877 de Spn PolI. Ambos límites de estos dominios, probablemente incluían más aminoácidos de los requeridos para el desarrollo de las actividades enzimáticas, pero no pudimos delimitar aún más los residuos que constituyen el dominio de actividad nucleásica debido a la ausencia de actividad enzimática en el plásmido pSM380.

### **Análisis cuantitativo de las actividades enzimáticas de los polipéptidos derivados de la DNA Polimerasa I de *S. pneumoniae***

La determinación de actividades enzimáticas en extractos crudos permite la valoración comparativa de polipéptidos derivados de Spn PolII, ya que la obtención del extracto es un proceso rápido y homogéneo para todas las muestras, y como consecuencia del tratamiento se produce en los extractos un nivel similar de inactivación proteica.

Las determinaciones de las actividades polimerásica y CAT se realizaron en extractos celulares de la estirpe *S. pneumoniae* 641, deficiente en la exo- y endonucleasa mayoritarias. La valoración de la actividad CAT se utilizó como control interno del estado del extracto. Los niveles de actividad CAT son similares en todas las estirpes analizadas (Tabla IV) independientemente de la orientación y localización del gen *cat*. Spn PolII es la polimerasa mayoritaria de neumococo y por ello no ofreció ninguna dificultad su detección en los extractos (Martínez y cols, 1986), solamente los plásmidos pSM29 y pSM37 codificaban un polipéptido con actividad polimerásica. En el extracto de *S. pneumoniae* 641[pSM29] el nivel de actividad polimerásica fue 14 superior al detectado en el extracto de la estirpe sin plásmido, mientras que la presencia del plásmido pSM37 confirió a la estirpe 641 un incremento de sólo 5 veces en actividad polimerásica.



**Fig. 18. Síntesis de Spn PolIn264 a partir de cultivos de *E. coli*.** Calles 1-4, extractos de *E. coli* BL21(DE3)[pET-5]; Calles 5-8, extractos de *E. coli* BL21(DE3)[pSM380]. Los cultivos fueron incubados con 0,5 mM IPTG durante distintos períodos de tiempo, 30 min (calles 1 y 5), 60 min (calles 2 y 6), 90 min (calles 3 y 7), 120 min (calles 4 y 8), a continuación fueron marcados con [<sup>35</sup>S]-metionina durante 5 min y lisados. Las proteínas de los extractos fueron separadas mediante SDS-PAGE (10 al 20% de PAA), se muestra la autorradiografía de dicho gel. Se indica la posición de la proteína de 31 kDa codificada por el gen *polA* $\Delta$ (791-1861bp).

**Tabla IV:** Actividad DNA polimerasa y CAT en extractos celulares

Plásmidos	Actividad enzimática <sup>a</sup> (U/mg proteína)	
	Polimerasa	CAT
pSM28	24	553
pSM29	324	540
pSM37	111	493
pSM38	22	551
pSM41	25	498
Ninguno	24	-

<sup>a</sup> Las actividades enzimáticas se valoraron como se indica en el apartado de Técnicas Especiales de Métodos.

**Tabla V:** Productos ácido solubles generados por las estirpes *S. pneumoniae* 641 y 641[pSM29], a partir de DNA bicatenario marcado en el extremo 5''

Condiciones de reacción	DNA degradado <sup>b</sup> (%)	
	641	641[pSM29]
Tris 10mM pH 7,6	0,1	0,1
Tris, MnCl <sub>2</sub> 2mM	5,0	27,4
Tris, MgCl <sub>2</sub> 6,5mM	2,9	7,2
Tris, CaCl <sub>2</sub> 2mM	0,4	0,5
Tris, ZnCl <sub>2</sub> 2mM	0,4	0,4

<sup>a</sup> Los ensayos se realizaron según se indica en Métodos.

<sup>b</sup> El porcentaje de DNA degradado se calculó dividiendo el DNA soluble radiactivo liberado en cada una de las muestras entre el total de radiactividad incorporada al ensayo.

En extractos celulares de las estirpes *S. pneumoniae* 641 y 641[pSM29] se cuantificaron los niveles de actividad nucleásica en distintas condiciones de reacción, para optimizar la detección de actividades exonucleásicas adscribibles a Spn PolI. El sustrato empleado en la reacción fue DNA de doble cadena marcado radiactivamente en el extremo 5'. El tampón de reacción fue suplementado con distintos cationes divalentes ( $MnCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  ó  $ZnCl_2$ ) y se valoró la radiactividad liberada (Tabla V). Únicamente se detectó liberación de marca radiactiva ácido soluble, indicativa de actividad exonucleásica 5'→3', en presencia de  $MnCl_2$  y  $MgCl_2$ . Dicha actividad enzimática, en presencia de  $MnCl_2$ , fue 5 veces superior en los extractos obtenidos a partir de la estirpe 641[pSM29] que en aquellos provenientes de la estirpe sin plásmido. Esta diferencia en los niveles de actividad fue solo de 2 veces en presencia de  $MgCl_2$ .

Intentamos detectar una posible actividad exonucleásica 3'→5' de Spn PolI en la estirpe 641[pSM29], pero no se observó en esta estirpe ningún incremento en la degradación de DNA monocatenario marcado en el extremo 3', respecto a los extractos de la estirpe sin plásmido, en todas las condiciones ensayadas ( $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $KCl$ ,  $MgCl_2+KCl$ ,  $MnCl_2+KCl$ ,  $MnCl_2+NaCl$ ) (datos no mostrados). Utilizando como sustrato DNA bicatenario marcado en el extremo 3' se observó un incremento de 1,5 a 2 veces en los extractos de la estirpe portadora del plásmido pSM29 respecto a los extractos de la estirpe control en presencia de  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$  y c/s cationes monovalentes (Tabla VI). Se amplió el rango de concentraciones de  $MgCl_2$  y  $MnCl_2$  a 2, 10 y 25 mM, obteniéndose el mismo resultado como se muestra en la Tabla V. Estos datos sugieren que Spn PolI podría carecer de la actividad exonucleásica 3'→5', o ser tan minoritaria que imposibilitaría su detección sobre el fondo de actividad exonucleásica 3'→5' de la estirpe *S. pneumoniae* 641.

A continuación se determinó la actividad exonucleásica 5'→3' de los diferentes derivados de Spn PolI en presencia de  $MnCl_2$  2 mM. En la Fig. 19 se representa el porcentaje de radiactividad liberado respecto a la marca total de DNA utilizado en el ensayo, en función del tiempo de incubación. Se analizó la cinética de liberación de productos radiactivos a partir de los extractos *S. pneumoniae* 641 sin o con los plásmidos pSM28, pSM29, pSM37, pSM38 y pSM41. Únicamente se observó una mayor degradación de DNA marcado en el extremo 5' sobre el nivel basal, en los extractos de la estirpe conteniendo los plásmidos pSM29, pSM28 ó pSM41, aunque los derivados Spn PolI de estas dos últimas estirpes presentaban una leve disminución de la actividad exonucleásica respecto al enzima silvestre codificada por el plásmido pSM29.

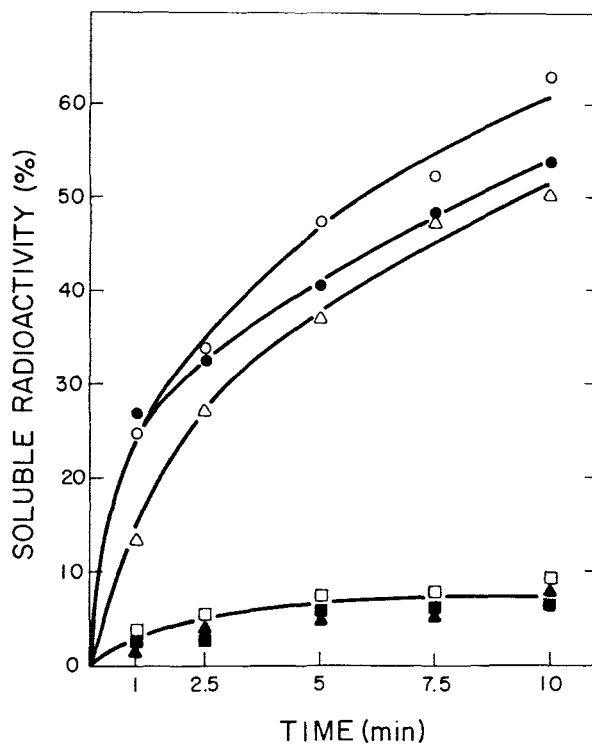
Las determinaciones de las actividades enzimáticas mostradas confirmaron los resultados obtenidos en la detección de actividad polimerásica *in situ* en PAGE-SDS y permitieron localizar el dominio de actividad exonucleásica entre los residuos 1 y 351 del extremo amino terminal de Spn PolI, revelándose una ligera pérdida de actividad enzimática en las proteínas truncadas codificadas por los plásmidos pSM28 y pSM41.



**Tabla VI:** Productos ácido solubles generados por las estirpes *S.pneumoniae* 641 y 641[pSM29], a partir de DNA bicatenario marcado en el extremo 3<sup>a</sup>

Condiciones de reacción	DNA degradado <sup>b</sup> (%)	
	641	641[pSM29]
Tris 10mM pH 7,6	2,2	3,3
Tris, MnCl <sub>2</sub> 2mM	15,4	34,2
Tris, MnCl <sub>2</sub> 10mM	15,0	42,0
Tris, MnCl <sub>2</sub> 25mM	14,5	38,0
Tris, MgCl <sub>2</sub> 2mM	13,5	14,7
Tris, MgCl <sub>2</sub> 10mM	7,0	11,1
Tris, MgCl <sub>2</sub> 25mM	3,7	5,6
Tris, CaCl <sub>2</sub> 2mM	3,7	3,4
Tris, ZnCl <sub>2</sub> 2mM	1,3	1,2
Tris, KCl 10mM	2,6	2,8
Tris, MgCl <sub>2</sub> 10mM, KCl 10mM	6,8	8,8
Tris, MnCl <sub>2</sub> 2mM, KCl 10mM	36,1	64,1
Tris, MnCl <sub>2</sub> 2mM, NaCl 10mM	21,5	42,8

<sup>a</sup> y <sup>b</sup> como en Tabla V.



**Fig. 19.** Actividad exonucleásica de las proteínas codificadas por los genes silvestre y mutantes de *S. pneumoniae*. Extractos crudos conteniendo 0,75  $\mu\text{g}$  de proteínas fueron incubados a 37 °C con un fragmento de DNA bicatenario de 2 kb, marcado en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}[\text{ATP}]$  (12.500 cpm). Se valoró, a los tiempos indicados, la radiactividad soluble en cada una de las muestras de los extractos 641 (cuadrado blanco) ó 641 con los plásmidos pSM29 (círculo blanco), pSM28 (círculo negro), pSM41 (triángulo blanco), pSM38 (triángulo negro), ó pSM37 (cuadrado negro).

## LA DNA POLIMERASA I DE *S. PNEUMONIAE* NO POSEE ACTIVIDAD EXONUCLEASICA 3' → 5'

### Actividad exonucleolítica de la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* sobre oligonucleótidos marcados en el extremo 5'

El análisis de las actividades exonucleásicas de Spn PolI se llevo a cabo utilizando una preparación pura de Spn PolI obtenida a partir del sistema de hiperexpresión de *E. coli* y purificada como se indica en el apartado de Técnicas Específicas de Métodos. Se realizó un experimento comparativo de las actividades nucleásicas de Spn PolI y Eco PolI. Se analizaron los productos de las actividades exonucleásicas de estas dos polimerasas en un gel de poliácridamida desnaturante al 20%, utilizando como sustrato un oligonucleótido 17-mer, marcado radiactivamente en el extremo 5', anillado o no a la monocadena del bacteriófago M13mp2 (Fig. 20). Eco PolI mostró sus dos actividades nucleásicas sobre los dos sustratos analizados: la exonucleasa 5'→3' generaba mono y dinucleótidos marcados y la exonucleasa 3'→5' produce un oligonucleótido 16-mer, convertido con el tiempo y presumiblemente por sucesivos ataques del enzima en oligonucleótidos de 15- y 14-mer marcados (Fig. 20, calles 11-20). Spn PolI mostró solo actividad exonucleásica 5'→3' sobre ambos sustratos (Fig. 20, calles 1-10). El producto mayoritario de la reacción fue 5' [<sup>32</sup>P] deoxinucleósido monofosfato, aunque también se detectaron otros productos minoritarios, di- y trinucleótidos. Por densitometría se cuantificó la liberación de dNMP generado por Spn PolI a partir de ambos sustratos, observándose que la producción de dNMP a partir de ssDNA era de un 25% respecto al mononucleótido total liberado desde dsDNA. Se repitió este mismo experimento utilizando concentraciones crecientes de Spn PolI, detectándose únicamente los productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' (datos no mostrados). Estos datos nos permiten predecir que si Spn PolI tuviera una actividad exonucleásica 3'→5' sería menos del 6% de la que posee Eco PolI, ya que la actividad del enzima de *E. coli* fue detectada con 0,06U, y sin embargo incrementando Spn PolI en el ensayo hasta 1U no se reveló esta actividad.

La actividad exonucleásica 3'→5' de Eco PolI elimina preferentemente nucleótidos incorrectamente apareados durante la polimerización (revisado en Kunkel, 1988). Era posible que a pesar de no detectar en los anteriores ensayos una actividad exonucleásica 3'→5' adscribible a Spn PolI, ésta existiera y actuará exclusivamente sobre un sustrato bicatenario con el extremo 3' mal apareado. Se analizó esta posibilidad empleando como sustrato un oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' anillado a la monocadena del fago M13mp2, con un par de bases mal apareadas (timina-guanina) situadas en el "primer terminus". Este sustrato se sintetizó como se indica en el apartado de Métodos. A partir de este sustrato, y en diferentes condiciones de reacción: pH (5, 7 y 9) y catión divalente (MnCl<sub>2</sub> 0,05 mM y 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 6,5 mM), el único producto detectado fue dNMP generado por la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI (datos no mostrados).



**Fig. 20. Actividades exonucleásicas de Spn PolI y Eco PolI sobre DNA bicatenario y monocatenario.** Se analizaron los productos generados por la actividad exonucleásica de Spn PolI (0,02 U) en presencia de 5 mM  $MnCl_2$  (calles 1-10) y 0,06 U de Eco PolI en presencia de 10 mM  $MgCl_2$  (calles 11-20). Las mezclas de reacción contienen 22 fmol de oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' con  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$  anillado a la monocadena del fago M13mp2 como sustrato bicatenario (calles 1-5 y 11-15) o sin anillar como sustrato monocatenario (calles 6-10 y 16-20). Se incubó la reacción a 37°C durante 2,5 min (calles 1, 6, 11 y 16), 10 min (calles 2, 7, 12 y 17), 30 min (calles 3, 8, 13 y 18), 1 h (calle 4, 9, 14 y 19), 2 h (calles 5, 10, 15 y 20). Calle C, ensayo sin enzima. Se analizaron los productos de la reacción mediante electroforesis en un gel de PAA (al 20%) desnaturalizante. En la autorradiografía de dicho gel se señalan a la izquierda las posiciones del sustrato 17-mer y del producto 1-mer.

### Ausencia de actividad correctora en la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae*

La actividad correctora de Spn PolI fue analizada mediante el ensayo de escisión de una base mal apareada según el método descrito por Kunkel y cols, (1987). Se utilizó como sustrato un DNA "gapeado" construido a partir del DNA de los fagos M13mp2G103 y M13mp2A103 (véase apartado de Métodos). El DNA sustrato contiene un "gap" de 363 nt y en el extremo 3'-OH terminus presenta una citosina apareada con una adenina. En el ensayo este sustrato "gapeado" fue convertido en la forma RFII del fago M13, mediante tratamiento con un enzima DNA polimerasa. Si ésta no posee una actividad correctora se produce el relleno del "gap" sin previa escisión de la citosina mal apareada, generándose un heteroduplex completo. Con este DNA se transforman las células, produciéndose un 50% de placas azul intenso y un 50% de placas azul claro. La presencia de una actividad correctora en la polimerasa eleva la proporción de placas azul claro frente a las azul intenso.

En el ensayo de detección de actividad correctora se utilizaron los enzimas Eco PolIK y Taq Pol como control positivo y negativo de la reacción, respectivamente (Tabla VII). La transformación con el producto de reacción de Eco PolIK generó un número de placas de color azul claro superior al 90%, como consecuencia de la presencia de la actividad exonucleásica 3'→5' de este enzima (revisado en Kunkel, 1988 y Tabla VII). Esta actividad correctora de Eco PolIK fue prácticamente anulada por la adición en el ensayo de TMP, que es un inhibidor de la actividad exonucleásica 3'→5' de Eco PolIK (Que y cols, 1978). Por el contrario, el porcentaje de placas color azul intenso (40%) obtenido con el producto de la reacción con Taq Pol, muestra la ausencia de actividad correctora de este enzima, como ya habían indicado Tindall y Kunkel, (1988).

Las polimerizaciones realizadas con Spn PolI, en presencia de MgCl<sub>2</sub> 6,5 mM ó MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM y dNTP 10 μM, y posterior transformación, revelaban la ausencia de actividad correctora en esta polimerasa, ya que el 50% de las placas tras la infección fueron de color azul intenso. La sustitución de MgCl<sub>2</sub> 6,5 mM por MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM en la reacción de polimerización con Spn PolI provocó una disminución de aproximadamente un 30 % en la actividad polimerásica, valorada como incorporación de TMP tritiado en DNA de esperma de salmón activado (resultado no mostrado). Esta reducción de la actividad polimerásica de Spn PolI no impidió el relleno íntegro del "gap" y la obtención de la forma de DNA RFII. La reacción de polimerización realizada con Spn PolI en presencia de MnCl<sub>2</sub> 5 mM fue acompañada del incremento en la concentración del sustrato dNTP a 1 mM, ya que a concentraciones más bajas de sustrato no pudo ser convertido el DNA "gapeado" en la forma RFII. El DNA molde en presencia de MnCl<sub>2</sub> 5 mM y dNTP 10 μM sufría degradación nucleolítica, presumiblemente debido a la acción exonucleásica 5'→3' de Spn PolI (que presenta su óptimo a esta concentración) y a una reducción de la actividad polimerásica a un 11%. En las condiciones descritas de polimerización con MnCl<sub>2</sub> 5 mM, el porcentaje de placas de color azul claro respecto al número de placas totales analizadas, aumentaba en función del tiempo de polimerización, y era

Tabla VII: Ausencia de actividad exonucleasa correctora asociada con Spn PolI<sup>a</sup>

Sustrato	Enzima	Cación y Concentración	dNTP ( $\mu$ M)	dTTP ( $\mu$ M)	Tiempo de reacción	Placas analizadas		% Retención de mal apareamiento
						Total	Azul Intenso	
DNA gapeado con un apareamiento terminal A-C	Eco PolIK	Mg <sup>2+</sup> 6,5 mM	10	0	15	1.897	147	7,7
	Eco PolIK	Mg <sup>2+</sup> "	10	20	15	859	340	39,6
	Taq PolI*	Mg <sup>2+</sup> "	10	0	15	2.760	1.106	40,1
	Spn PolI	Mg <sup>2+</sup> "	10	0	5	1.543	773	50,1
	Spn PolI	Mg <sup>2+</sup> "	10	0	15	1.620	796	49,1
	Spn PolI*	Mn <sup>2+</sup> 0,1mM	10	0	15	434	218	50,3
	Spn PolI*	Mn <sup>2+</sup> "	10	0	30	1.140	524	46,0
	Spn PolI	Mn <sup>2+</sup> 5,0 mM	1.000	0	5	1.033	264	25,5
	Spn PolI	Mn <sup>2+</sup> "	1.000	20	5	852	256	30,0
	Spn PolI	Mn <sup>2+</sup> "	1.000	0	15	1.152	35	3,0
	Spn PolI	Mn <sup>2+</sup> "	1.000	20	15	1.568	52	3,3
DNA gapeado con un apareamiento interno A-C	Spn PolI	Mn <sup>2+</sup> "	1.000	0	5	2.410	884	36,6
	Spn PolI	Mn <sup>2+</sup> "	1.000	20	15	2.844	265	9,3
RFII con un apareamiento A-C <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	1.235	750	60,7
DNA gapeado con un apareamiento terminal A-C	-	-	-	-	-	3.724	91	2,4

<sup>a</sup> Los resultados mostrados en la Tabla se obtuvieron en experimentos realizados como se indica en Técnicas Específicas de Métodos.

<sup>b</sup> DNA bicatenario del fago M13mp2 con un apareamiento interno A-C y una rotura monocatenaria en la posición del sitio AvaII

independiente de la adición de TMP al ensayo (Tabla VII). Estos resultados podrían indicar una acción correctora de Spn PolI distinta a la observada en Eco PolIK, o una eliminación de la citosina mal apareada después de completarse una ronda de polimerización del DNA del fago M13mp2. Esta acción de Spn PolI requeriría un acoplamiento de las actividades exonucleásica 5'→ 3' y polimerásica de una sola molécula (en una reacción de "nick translation") o de dos moléculas actuando en los extremos 3' y 5' del sustrato con distinta actividad. Para verificar la hipótesis correcta utilizamos un nuevo sustrato bicatenario circular que posee el par de bases mal apareadas situado internamente, a 47 nt del extremo 3'-OH, y un "gap" de 316 nt. Después de la reacción de polimerización con Spn PolI en presencia de MnCl<sub>2</sub> 5 mM y dNTP 1 mM, el porcentaje de placas azul claro fue similar al obtenido con el sustrato que presenta el heteroduplex en el "primer terminus" (Tabla VII) e incrementaba en función del tiempo de reacción. Estos resultados indican que la actividad correctora de Spn PolI detectada en el ensayo es consecuencia de la acción conjunta de las actividades exonucleásica 5'→ 3' y polimerásica, y no debida a una actividad exonucleásica 3'→ 5'.

Para analizar el comportamiento polimerizante o degradativo de Spn PolI en el ensayo de detección de actividad correctora, se realizaron valoraciones de actividad polimerásica y nucleásica de Spn PolI sobre DNA de esperma de salmón en las mismas condiciones de reacción (Tabla VIII). Los datos presentados muestran: 1) la actividad polimerásica de Spn PolI es 6 veces superior en presencia de MgCl<sub>2</sub>, respecto a MnCl<sub>2</sub>, 2) la actividad exonucleásica de Spn PolI es 3 veces más elevada con MnCl<sub>2</sub> que con MgCl<sub>2</sub>, 3) la relación de actividad polimerásica a exonucleásica de Spn PolI valoradas en MgCl<sub>2</sub> y MnCl<sub>2</sub>, respectivamente es de 2,3, mientras que esta relación de actividades en presencia de MnCl<sub>2</sub> 5 mM es de 0,4. Esta alteración en la proporción de actividad polimerásica a exonucleasa en Spn PolI, indica un aumento de la actividad exonucleásica y una disminución de la polimerásica en el ensayo de actividad correctora. Los datos de la Tabla VIII apoyan la ausencia de actividad correctora en Spn PolI con MgCl<sub>2</sub>, ya que la actividad exonucleásica 5'→ 3' se reduce al 30%, y Spn PolI probablemente no degradaría el DNA en dirección 5'→ 3' de forma tan extensiva, no eliminando la citosina mal apareada del extremo 3'.

## ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD EXONUCLEASICA 5'→ 3'

### Comparación de las actividades catalíticas de Spn PolI y Eco PolI

La actividad exonucleásica 5'→ 3' de Spn PolI se valoró en función de la liberación de productos ácido solubles generados a partir de DNA de esperma de salmón tritado, en presencia de MnCl<sub>2</sub> 5 mM ó MgCl<sub>2</sub> 6,5 mM. La actividad exonucleásica de Spn PolI es superior con MnCl<sub>2</sub> (Tabla VIII y IX) y es potenciada levemente en presencia de dNTPs, sustrato de la actividad polimerásica (véase Tabla VIII). Este efecto es similar al observado en los enzimas

**Tabla VIII:** Actividades exonucleásica y polimerásica de Spn Poll sobre DNA de esperma de salmón

Enzima	Cation <sup>a</sup>	dNTP ( $\mu$ M)	Actividad (U/ $\mu$ l) <sup>b</sup>	
			Polimerasa	Exonucleasa
Spn Poll	Mg <sup>2+</sup>	-	-	0,04
Spn Poll	Mn <sup>2+</sup>	-	-	0,15
Spn Poll	Mg <sup>2+</sup>	10	0,32	0,06
Spn Poll	Mn <sup>2+</sup>	1.000	0,028	0,19

<sup>a</sup> El ensayo se realizó a una concentración de 6,5 mM ClMg<sub>2</sub> ó 5 mM ClMn<sub>2</sub> como se describe en Técnicas Específicas de Métodos.

<sup>b</sup> La actividad enzimática se expresó en unidades de enzima valoradas en 1  $\mu$ l de la preparación de Spn Poll.

**Tabla IX:** Actividades exonucleásica y polimerásica de Spn Poll y Eco Poll sobre DNA de esperma de salmón

Enzima	Cation <sup>a</sup>	Actividad <sup>b</sup> (U/ $\mu$ l)	
		polimerasa <sup>c</sup>	exonucleasa
Spn Poll	Mg <sup>2+</sup>	0,44	0,04
Spn Poll	Mn <sup>2+</sup>	0,06	0,15
Eco Poll	Mg <sup>2+</sup>	4,40	0,83
Eco Poll	Mn <sup>2+</sup>	0,17	0,07

<sup>a</sup> El ensayo se realizó a una concentración de 6,5 mM ClMg<sub>2</sub> ó 5 mM ClMn<sub>2</sub> como se describe en el apartado de Técnicas Específicas de Métodos.

<sup>b</sup> La actividad enzimática se expresó en unidades de enzima valoradas en 1  $\mu$ l de las preparaciones de Spn Poll y Eco Poll.

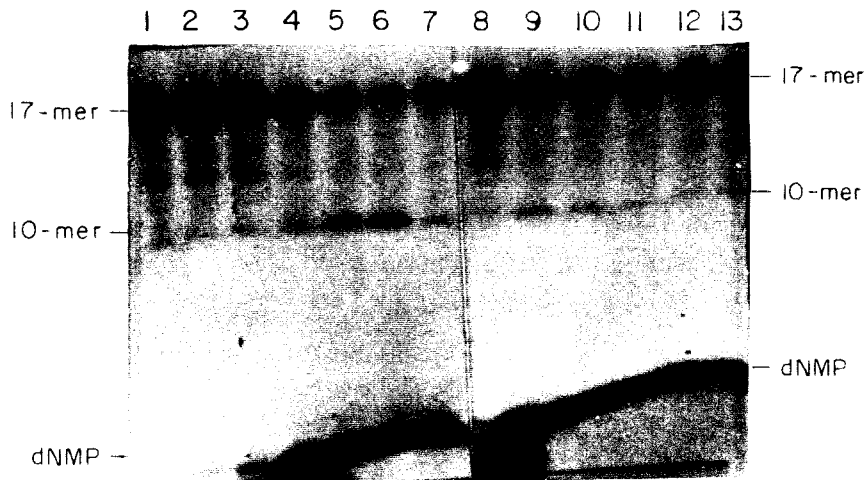
<sup>c</sup> La actividad polimerásica se valoró mediante la incorporación de 50 $\mu$ M de dATP, dCTP y dGTP, 15 $\mu$ M dTTP y 100nCi[<sup>3</sup>H]dTTP a 40Ci/mmol



Eco PolI y Taq Pol (Setlow y Kornberg, 1972; Abramson y cols, 1992). La actividad polimerásica de Spn PolI se valoró mediante la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]TTP en DNA de esperma de salmón activado, en presencia de cada uno de los cationes divalentes ( $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ) (Tabla IX). La actividad polimerásica fue 6 veces superior con  $\text{MgCl}_2$ . La relación de actividad exonucleásica a polimerásica fue 0,10 y 2,27 en ensayos realizados con  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{MnCl}_2$ . A continuación valoramos la actividad exonucleásica y polimerásica de Eco PolI con los mismos sustratos. La cuantificación de la actividad exonucleásica 5'→3' de Eco PolI se sobrestimó por la acción sobre el sustrato de la actividad degradativa en dirección 3'→5', sin embargo es posible eliminar la contribución de la actividad exonucleásica 3'→5' aplicando una reducción de un 20% en la actividad exonucleásica total (Setlow, 1974). La relación de actividad exonucleásica a polimerásica en Eco PolI en presencia de  $\text{MgCl}_2$  ó  $\text{MnCl}_2$ , fue de 0,15 y 0,36. Un resultado similar fue obtenido por Setlow (1974) en la valoración de las actividades catalíticas de Eco PolI en presencia de  $\text{MgCl}_2$ . Spn PolI y Eco PolI mantienen una relación similar en sus dos actividades enzimáticas valoradas en presencia de  $\text{MgCl}_2$ , sin embargo esta proporción es alterada significativamente en Spn PolI en presencia del catión divalente  $\text{Mn}^{+2}$ . En estas condiciones se produce una modificación del comportamiento de ambas actividades de Spn PolI en relación a Eco PolI. La actividad polimerásica de Spn PolI descendió solo 4 veces, respecto a la reducción de 26 veces en Eco PolI. Además la actividad exonucleásica se incrementó 3,5 veces en Spn PolI y disminuyó 11 veces en Eco PolI. Aunque si se relacionan los valores de las actividades exonucleásica y polimerásica de Spn PolI en presencia de  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  respectivamente, se obtiene una tasa de 0,34, próxima a la mostrada por Eco PolI (Tabla IX y Setlow, 1974). La comparación de la actividades catalíticas de Spn PolI y Eco PolI demuestra que ambas enzimas poseen una actividad relativa exonucleásica 5'→3' similar.

### **Concentración óptima de cationes divalentes en la catálisis de la actividad exonucleásica 5'→3'**

La actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI requiere  $\text{MgCl}_2$  ó  $\text{MnCl}_2$  sobre sustratos lineales marcados, como se ha demostrado con extractos crudos (véase Tabla V). A continuación estudiamos la influencia de distintas concentraciones de estos cationes en el desarrollo de esta actividad enzimática sobre un sustrato bicatenario constituido por un oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' anillado a la monocadena del fago M13mp2. Se realizó el ensayo en distintas condiciones de reacción, modificándose la concentración del catión divalente ( $\text{MnCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ ) (Fig. 21, calles 1-13). El producto mayoritario de la actividad exonucleásica 5'→3' fue un deoxinucleótido marcado que procedía del extremo 5' del oligonucleótido 17-mer, éste se detectó en un rango de concentraciones de 0,1 mM a 25 mM de  $\text{MnCl}_2$  (Fig. 21, calles 2-7), siendo la concentración óptima 5 mM (Fig. 21, calle 6). La actividad exonucleásica 5'→3' generó otro producto de mayor talla, un oligonucleótido de 10-mer que se liberó principalmente a 5 mM de  $\text{MnCl}_2$ . El ensayo realizado con distintas concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  (Fig. 21, calles



**Fig. 21. Concentración óptima de cationes divalentes.** Se incubaron 2,2 fmol de oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ [ATP] anillado a la monocadena del fago M13mp2 con 0,16 U de actividad exonucleásica de Spn PolI. Se suplementó la mezcla de reacción con 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 5 mM, 25 mM de  $\text{MnCl}_2$  (calles 2-7) y 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 25 mM, 50 mM, 100mM de  $\text{MgCl}_2$  (calles 8-13). La reacción se incubó 30 min a 37°C. Calle 1, ensayo sin enzima. Las posiciones del sustrato 17-mer, y los productos 10-mer y dNMP son señaladas a ambos lados de la Fig. Se analizaron los productos de las reacciones como se indica en la Fig. 20.

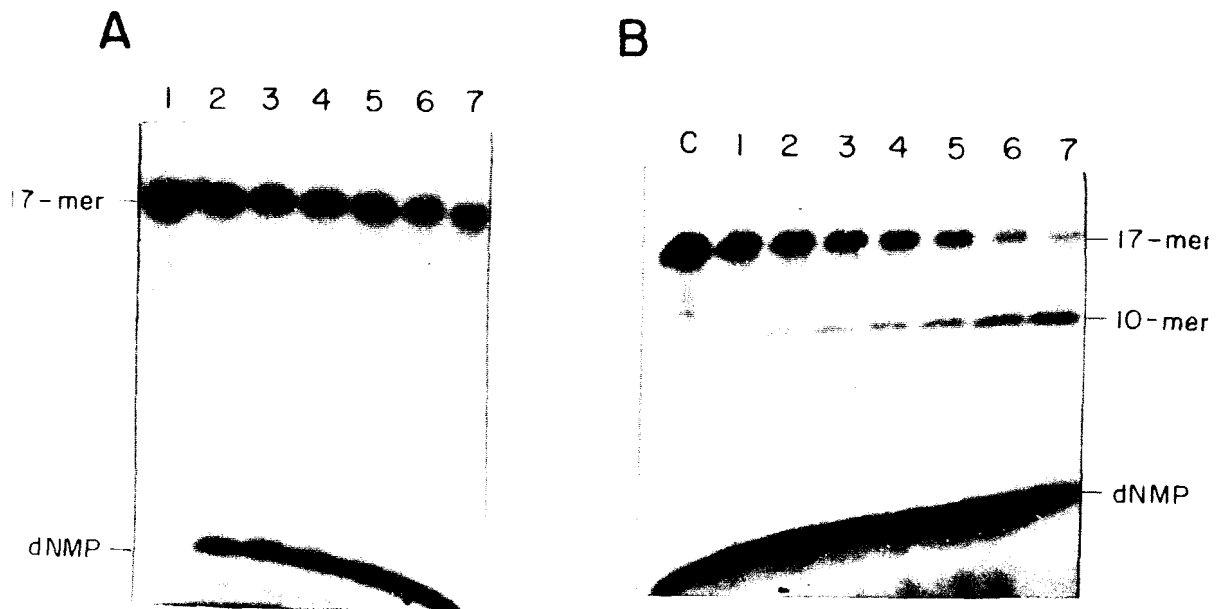
8-13), muestra un rango de acción degradativa muy amplio (0,1-50 mM). El análisis por densitometría de la autorradiografía del gel indicó que la actividad exonucleásica de Spn PolI fue 3 veces superior en presencia de 5 mM MnCl<sub>2</sub>, respecto a 10 mM MgCl<sub>2</sub>. La concentración óptima de estos dos cationes es diferente, pero es independiente de la naturaleza mono o bicatenaria del DNA (dato no mostrado).

### **Productos generados por la actividad exonucleásica 5'→ 3' de Spn PolI a partir de un oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5'**

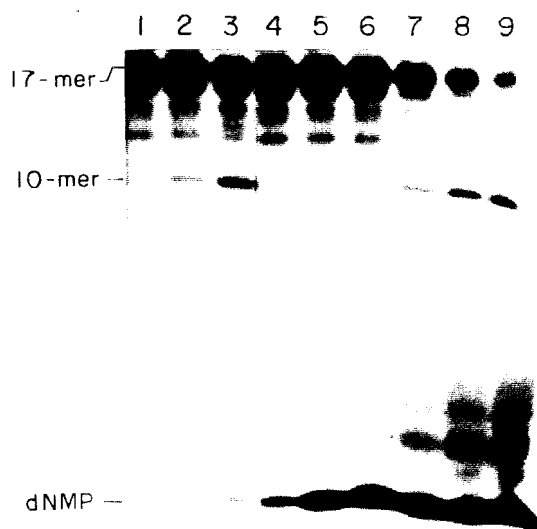
Se analizó la cinética de aparición de los productos generados por Spn PolI a partir del oligonucleótido 17-mer marcado radiactivamente en el extremo 5' y anillado a la monocadena del fago M13mp2. Se utilizaron dos concentraciones de enzima 0,01 U y 1 U de actividad exonucleásica (Fig. 22A y B). Se observaron dos productos de diferente talla generados por la acción degradativa de Spn PolI, un deoxinucleótido y un oligonucleótido de longitud 10-mer. La producción de este oligonucleótido dependía de la concentración de enzima utilizada en el ensayo. A 0,01 U de actividad exonucleásica (Fig. 22A) únicamente se visualizó un mononucleótido y a 1 U de Spn PolI se observaron dos productos, dNMP y un oligonucleótido 10-mer (Fig. 22B). Este último producto se generó a los 5 min de incubación del enzima con el sustrato, mientras que el dNMP estuvo presente desde la primera toma de muestra a 1 min. A 1U de actividad exonucleásica de Spn PolI la proporción del oligonucleótido 10-mer frente a dNMP representó como máximo un 15%.

A continuación se realizó un ensayo comparativo de los productos liberados por Spn PolI utilizando un sustrato nativo o desnaturalizado por calor (Fig. 23, calles 1-9). En igualdad de condiciones, siendo la única variable el tipo de sustrato, se generó mayor porcentaje de oligonucleótido 10-mer a partir de un sustrato monocatenario (Fig. 23, calles 1-3). La producción relativa de oligonucleótido 10-mer con un sustrato monocatenario fue de 2 a 6 veces superior que con el sustrato bicatenario, en función del tiempo de incubación. Sin embargo, el dNMP se produjo fundamentalmente con dsDNA, alcanzándose una saturación del 60% después de 10 min de incubación. En el ensayo de la Fig. 23, el porcentaje de dNMP generado a partir de ssDNA fue del 4% respecto a la radiactividad total. En otros ensayos no mostrados realizados con menor cantidad de enzima, la producción de dNMP alcanzó incluso un 15%. Estos últimos datos indican que a partir de un sustrato monocatenario y a concentraciones bajas de Spn PolI la producción de dNMP es mayor que a concentraciones más altas de enzima, en las que por el contrario se generan mayor proporción de oligonucleótidos.

Finalmente, se obtuvieron los mismos resultados a partir de otros oligonucleótidos 17-mer, desmostrando que la liberación y proporción de los productos es dependiente de la naturaleza bicatenaria o monocatenaria del sustrato, e independiente de la secuencia del oligonucleótido utilizado.



**Fig. 22.** Análisis de los productos generados por diferentes cantidades de Spn PolI. Se analizaron los productos generados por  $5 \times 10^{-3}$  U (A) y 1,1 U (B) de actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI. Se incubaron 13 fmol de oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ [ATP] anillado a la monocadena del fago M13, en presencia de 5mM  $\text{MnCl}_2$  y a 37°C. Se extrajeron muestras a distintos tiempos, 1 min, 2,5 min, 5 min, 7,5 min, 10 min, 20 min y 30 min (A y B, calles 1-7). En el panel B, la calle C se analizó una alícuota extraída inmediatamente después de incorporar el enzima al tubo de reacción. A derecha e izquierda de la Fig. se sitúan las posiciones del sustrato y productos de la reacción. Las muestras fueron sometidas a electroforesis como se indica en la Fig. 20.



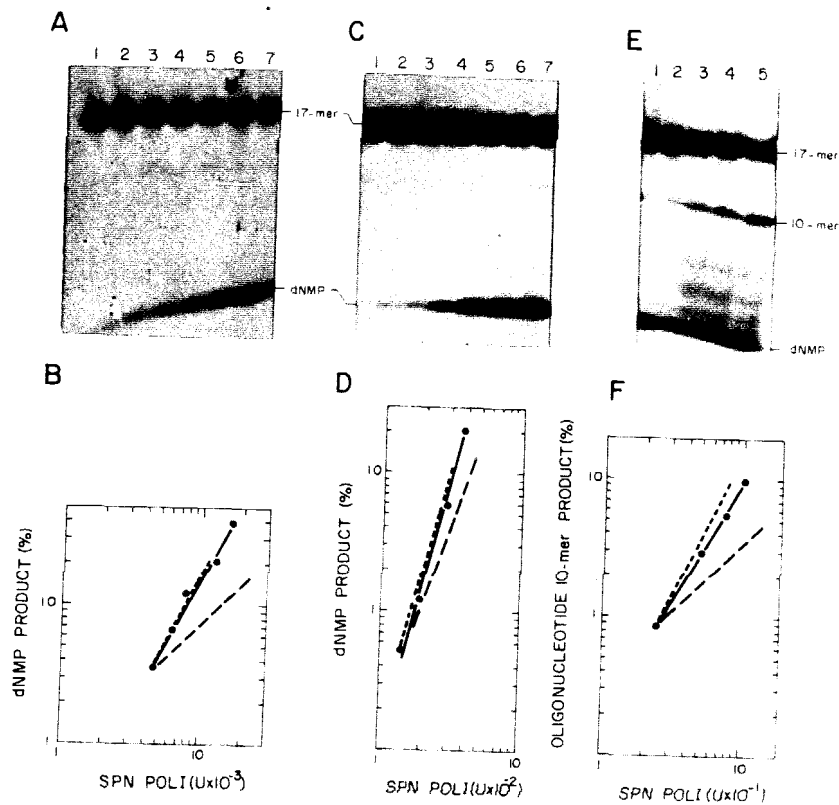
**Fig. 23. Productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn Poll a partir de sustratos mono y bicatenarios.** Se utilizó como sustrato 5,8 fmol de oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ [ATP] y se analizaron los productos generados por 0,11 U de actividad exonucleásica de Spn Poll. Se extrajeron alicuotas a distintos tiempos, 0 min, 2,5 min y 10 min (calles 1-3). De forma similar, se analizaron los productos generados a partir de 11,6 fmol de oligonucleótido marcado, anillado a la monocadena del fago M13, en presencia de 0,2 U de Spn Poll y se obtuvieron muestras a 0 min, 2,5 min, 10 min, 30 min, 1 h y 2 h (calles 4-9). Las reacciones enzimáticas se realizaron a 37°C y en presencia de 5 mM  $\text{MnCl}_2$ . A la izquierda de la autorradiografía se indican las posiciones del sustrato y los productos de la reacción. Las muestras fueron sometidas a electroforesis como se indica en la Fig. 20.

### **Análisis de los productos de la reacción exonucleásica a dosis crecientes de Spn PolI**

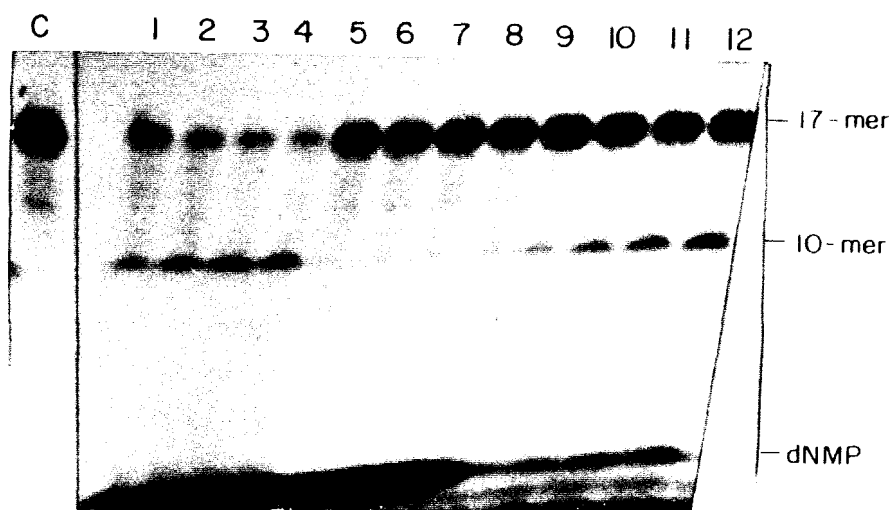
Se estudió el porcentaje de producto (dNMP u oligonucleótido 10-mer) generado por la actividad exonucleásica 5'→ 3', en función de la cantidad de enzima añadida al ensayo, en condiciones no limitantes de sustrato y linealidad con el tiempo de reacción. Para analizar el producto dNMP liberado a partir de un sustrato bicatenario (oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' y anillado a la monocadena de M13mp2), se escogió un tiempo de incubación de 5 min (Fig. 24 paneles A y B), y se añadieron dosis crecientes de Spn PolI ( $5 \times 10^3$  a  $1,6 \times 10^2$  U de actividad exonucleásica). La representación gráfica del porcentaje de dNMP liberado frente a la dosis de enzima (panel B) muestra una recta que se ajusta a la ecuación  $y=x^2$ , esto indica que al aumentar dos veces la dosis de enzima no se produce una liberación al doble de dNMP, sino que ésta es de 4 veces. Este mismo tipo de análisis se realizó con DNA monocatenario (oligonucleótido 17-mer marcado en su extremo 5'), un tiempo de incubación de 30 min y el rango de concentración de enzima utilizado fue  $9,4 \times 10^3$  a  $3,8 \times 10^2$  U de exonucleasa (Fig. 24 paneles C y D). Se representó el porcentaje de mononucleótido liberado frente a la dosis de enzima utilizada, y se obtuvo una recta que se aproximaba a la ecuación  $y=x^4$ , por lo que al incrementar al doble la cantidad de enzima, la liberación de dNMP aumenta 16 veces (panel D). Por último, se analizó la respuesta a la dosis del producto 10-mer generado a partir de DNA monocatenario, un tiempo de incubación de 5 min, y una concentración de enzima de  $1,2 \times 10^1$  a 1 U de exonucleasa (Fig. 24 paneles E y F). La representación gráfica de los datos mostró una línea recta próxima a la ecuación  $y=x^2$ . Estos datos sugieren la necesidad de un número diferente de moléculas de Spn PolI, implicadas en la catálisis o en la interacción de forma estática con el sustrato, para generar los distintos tipos de productos.

### **Comparación de los productos generados por Spn PolI, Spn PolIn620 y Spn Poln351a**

Se analizaron los productos (dNMP y oligonucleótido 10-mer) generados por 0,1U de actividad exonucleásica de las proteínas Spn PolI y los derivados PolIn620 y Poln351a (carentes de actividad polimerásica). En el ensayo se utilizó como sustrato el oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' y anillado a la monocadena del fago M13mp2 (Fig. 25). La liberación de productos y consunción de sustrato fue distinta en cada proteína, a pesar de utilizar en los tres experimentos 0,1 U de actividad exonucleásica, valorada sobre DNA de esperma de salmón tritiado. Estos resultados revelan probablemente diferentes características bioquímicas de cada polipéptido. Spn PolI y Spn PolIn620 liberan la misma proporción de dNMP (Fig. 25, calles 1-8), sin embargo Spn Poln351 genera 4 veces menos mononucleótido (Fig. 25, calles 9-12). Además, se observó que el oligonucleótido de 10-mer es preferentemente producido por Spn PolI y Spn Poln351a (Fig. 25, calles 1-4 y 9-12), constituyendo este producto prácticamente un 10% y un 50% relativo de la producción de dNMP, respectivamente. Por lo tanto, la relación



**Fig. 24. Productos generados por dosis crecientes de Spn PolI.** Se incubaron 25 fmol de oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' con <sup>32</sup>P[ATP], anillado a la monocadena del fago M13 (A), o sin anillar (C) y (E). Las reacciones se realizaron en presencia de 5 mM MnCl<sub>2</sub> y a 37 °C. (A) Se incubó el DNA sustrato durante 5 min con 0,004 U, 0,006 U, 0,008 U, 0,012 U y 0,016 U de actividad exonucleásica de Spn PolI (calles 1-7). (C) El DNA sustrato se incubó durante 30 min con 0,0094 U, 0,014 U, 0,019 U, 0,028 U, 0,037 U, 0,056 U, 0,075 U de actividad exonucleasa de Spn PolI (calles 1-7). (E) El DNA sustrato se incubó durante 10 min con 0,125 U, 0,25 U, 0,5 U, 0,75 U y 1 U de actividad exonucleásica de Spn PolI (calles 1-5). En las autorradiografías se indican las posiciones del sustrato y los productos de la reacción. Las muestras fueron sometidas a electroforesis como se indica en la Fig. 20. En la parte inferior de la Fig. se representa graficamente el porcentaje de dNMP generado en condiciones de enzima no saturante, a partir de un sustrato bicatenario (B) ó monocatenario (D), y el porcentaje de oligonucleótido 10-mer producido a partir de DNA monocatenario en condiciones de enzima no saturante (F).



**Fig. 25. Actividad exonucleásica comparativa entre Spn PolI y sus derivados.** Se incubaron 7,75 fmol de oligonucleótido 17-mer marcado en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ [ATP] anillado a la monocadena del fago M13. Se analizaron los productos generados por 0,1 U de actividad exonucleasa de Spn PolI (calles 1-4), Spn PolIn620 (calles 5-8) y Spn PolIn351a (calles 9-12). Se extrajeron alicuotas a distintos tiempos, 30 min (calles 1, 5 y 9), 60 min (calles 2, 6 y 10), 90 min (calles 3, 7 y 11) y 120 min (calles 4, 8 y 12). Se indica a la derecha de la Fig. las posiciones del sustrato y los productos de la reacción. Las muestras fueron sometidas a electroforesis como se indica en la Fig. 20.



de oligonucleótido-10 mer a mononucleótido fue mayor en Spn PolIn351a, que en la proteína silvestre.

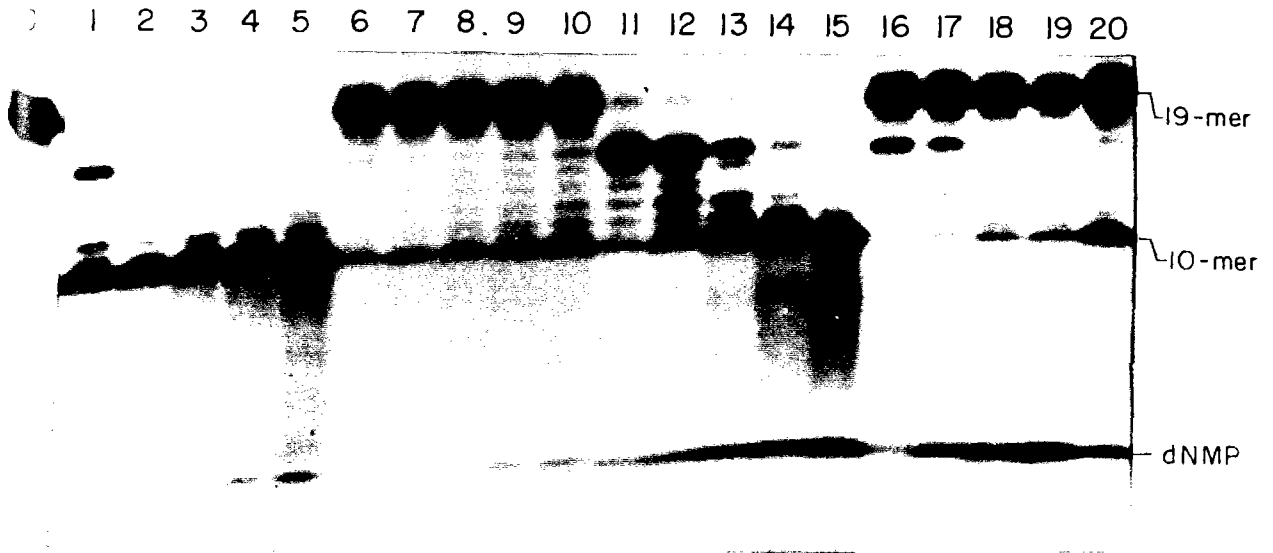
El incremento en la producción del oligonucleótido 10-mer a partir de la proteína truncada Spn PolIn351a, sugiere una posible modificación de la actividad exonucleásica 5' → 3' en proteínas derivadas del extremo amino terminal de Spn PolI.

### **Detección de los productos liberados por la actividad exonucleásica 5'→ 3' de Spn PolI a partir de sustratos marcados en el extremo 3'**

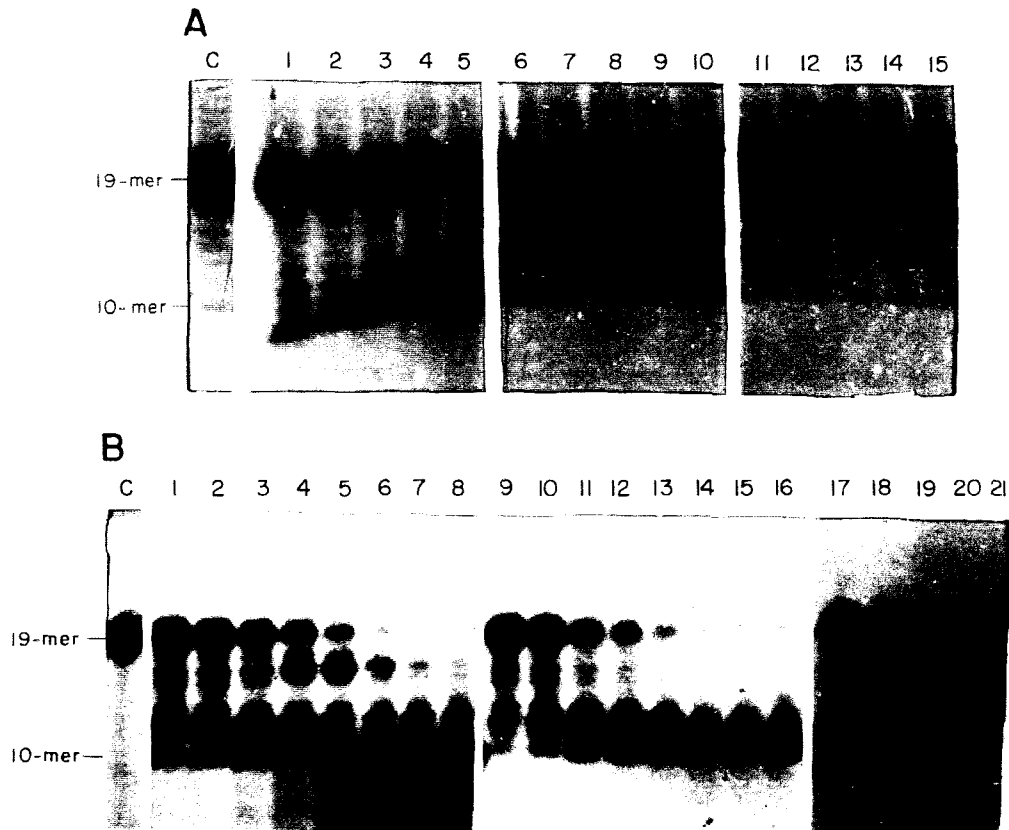
#### Degradación exonucleolítica de un oligonucleótido marcado en el extremo 3'

Se utilizó como sustrato un oligonucleótido 19-mer que poseía en su extremo 3' un dideoxinucleótido marcado (ddAMP), anillado a la monocadena del fago M13mp2. Se comparó el patrón degradativo de la actividad exonucleásica 5'→ 3' de Eco PolI y Spn PolI, eliminándose solo parcialmente la interferencia de la actividad exonucleásica 3'→ 5' de Eco PolI por la presencia de un residuo dideoxinucleótido en el extremo 3' del DNA. A pesar de este bloqueo Eco PolI consiguió eliminar en parte de las moléculas el residuo dideoxiadenina del extremo 3' (Fig. 26, calles 11-20). Ambas enzimas generaban sobre DNA bicatenario (Fig. 26, calles 1-5 y 11-15) un oligonucleótido a la posición de 16-mer, y como productos finales de la reacción se obtuvieron los oligonucleótidos de 12, 11 y 10-mer. A partir de DNA monocatenario, Eco PolI generó un patrón de productos similar al mostrado sobre DNA bicatenario, pero la proporción de DNA degradado fue mucho menor (Fig. 26, calles 16-20 versus 11-15). Spn PolI generó el producto de 10-mer después de un minuto de incubación con el DNA monocatenario, este producto podría surgir de una acción endonucleolítica desde el extremo 5', o por la liberación sucesiva de mononucleótidos desde el extremo 5' por una acción exonucleolítica (Fig. 26, calles 6-10). En ambas enzimas el producto más pequeño generado por la degradación en dirección 5'→ 3' y que no es reatacado fue el oligonucleótido 10-mer. Aunque este producto fue convertido de forma minoritaria en 1-mer.

Sobre el mismo tipo de sustrato bicatenario se analizó el comportamiento de Spn PolI y sus derivados deficientes en actividad polimerásica. Las tres proteínas degradaron el sustrato y acumularon un producto final de 10-mer, aunque en diferente proporción (Fig. 27A). Se intentó detectar los productos intermedios de la degradación secuencial exonucleásica 5'→ 3', mediante la disminución en el ensayo de la temperatura de incubación e incremento de la concentración de enzima (Fig. 27B). Se observaron oligonucleótidos de longitudes de 18 a 11 nt generados por los enzima Spn PolI (calles 1-8) y Spn PolIn620 (calles 9-16). La existencia de estos productos intermedios sugiere una eliminación secuencial de mononucleótidos desde el extremo 5' del sustrato.



**Fig. 26. Actividades exonucleásicas de Spn PolI y Eco PolI.** Se incubaron 10 fmol de oligonucleótido 19-mer marcado en el extremo 3' con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddATP}$  anillado a la monocadena de M13 (calles 1-5 y 11-15), o sin anillar (calles 6-10 y 16-20) con 0,2 U de actividad exonucleásica de Spn PolI, en presencia de 5 mM  $\text{MnCl}_2$  (calles 1-10) y 0,2 U de Eco PolI en presencia de 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (calles 11-20). Se extrajeron alicuotas a distintos tiempos, 2,5 min (calles 1, 6, 11 y 16), 10 min (calles 2, 7, 12 y 17), 30 min (calles 3, 8, 13 y 18), 1 h (calles 4, 9, 14 y 19) y 2h (calles 5, 10, 15 y 20). A la izquierda de la Fig. se indican las posiciones del sustrato y los productos de la reacción. Las muestras fueron sometidas a electroforesis como se indica en la Fig. 20.



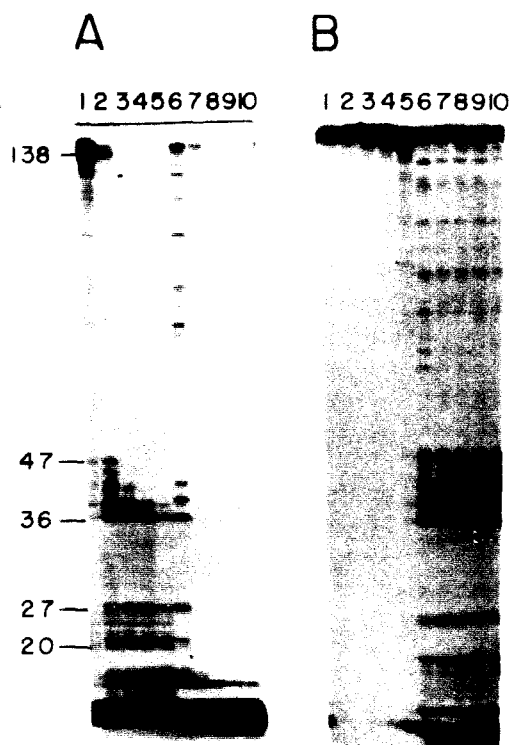
**Fig. 27. Actividad exonucleásica de Spn Poll y sus derivados.** (A) Se incubaron 22 fmol de oligonucleótido 19-mer marcado en el extremo 3' con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddATP}$  anillado a la monocadena de M13 con 0,04 U de actividad exonucleásica de Spn Poll (calles 1-5), de Spn Polln620 (calles 6-10) y Spn Polln351a (calles 11-15). Las reacciones se incubaron a 37°C y se extrajeron alicuotas a distintos tiempos, 2,5 min (calles 1, 6 y 11), 10 min (2, 7 y 12), 30 min (calles 3, 8 y 13), 1h (calles 4, 9 y 14) y 2h (calles 5, 10 y 15). (B) Este mismo sustrato se incubó con 0,2 U de actividad exonucleásica de Spn Poll (calles 1-8), ó Spn Polln620 (calles 9-16). Ambas reacciones se incubaron a 20 °C. El derivado Spn Polln351a (0,2 U) se incubó con el sustrato a 37 °C (calles 17-21). Se extrajeron alicuotas a distintos tiempos, 30 seg (calles 1 y 9), 1 min (calles 2 y 10), 2,5 min (calles 3, 11 y 17), 5 min (calles 4 y 12), 10 min (calles 5, 13 y 18), 30 min (calles 6, 14 y 19), 1 h (7, 15 y 20) y 2 h (calles 8, 16 y 21). La calle C, en A y B, es un control de reacción sin enzima. Los ensayos se realizaron en presencia de 5 mM  $\text{MnCl}_2$ . A la izquierda de la Fig. se indican las posiciones del sustrato 19-mer y el producto final 10-mer. Las muestras fueron sometidas a electroforesis como se indica en la Fig. 20.

### Actividad exonucleásica 5'→ 3' sobre fragmentos de DNA marcados en el extremo 3'

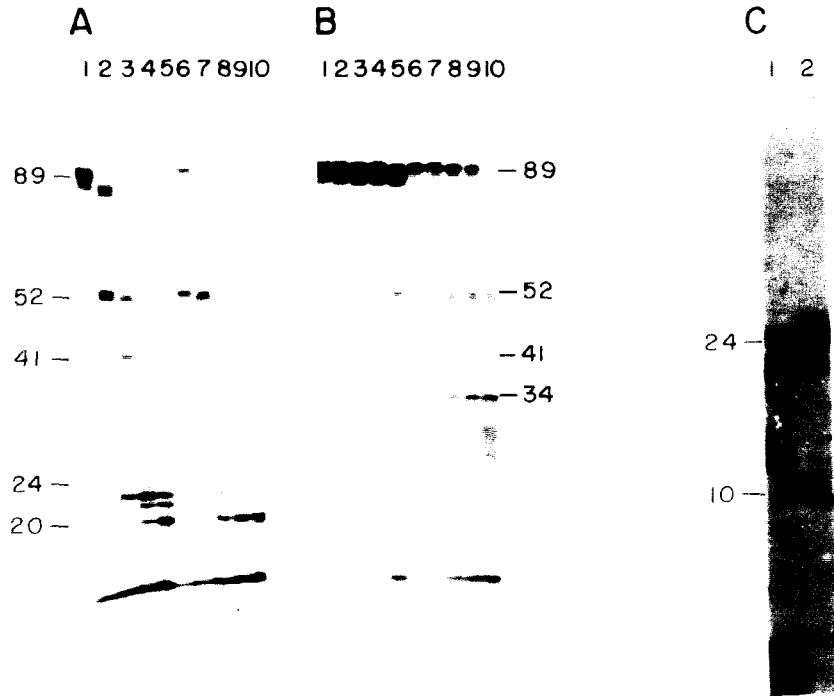
Se analizaron los productos liberados por Spn PolI a partir de un fragmento de 138 pb bi y monocatenario, marcado en el extremo 3' con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ddATP. Transcurrido el tiempo de incubación de la reacción los productos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 8% (Fig. 28). La degradación del fragmento de DNA monocatenario (extraído de un gel de poliacrilamida desnaturalizante, como se describe en Métodos) (Fig. 28 A y B, calles 6-10) fue mayor que la observada sobre el DNA bicatenario (Fig 28 A y B, calles 1-5), a cualquiera de las dos concentraciones de enzima ensayadas, 0,4 U y 0,1 U de exonucleasa (Fig. 28A y B). Estas unidades de actividad exonucleasa se corresponden con un número de moléculas de Spn PolI y del fragmento de DNA de 8:2 y 2:1, respectivamente. Los productos intermedios generados por Spn PolI se situaban en dos regiones próximas de 36 a 47 nt y de 20 a 27 nt. Los productos de menor talla mayoritarios se situaba en la parte baja del gel.

Se realizó un experimento similar al descrito en el párrafo anterior, con otro fragmento de DNA de 89 pb marcado radiactivamente en el extremo 3' (Fig. 29). Se utilizaron diferentes cantidades de enzima Spn PolI para analizar los productos generados a partir del fragmento bicatenario o desnaturalizado por calor. Con ambos sustratos los fragmentos acumulados fueron de un tamaño similar, pero nuevamente se observó una mayor degradación del sustrato monocatenario (Fig. 29, calles 6-10). Las bandas indicativas de disociación de enzima del sustrato o sitios de hidrólisis sobre DNA monocatenario son alcanzadas a tiempos más cortos, como consecuencia de una mayor capacidad de reataque sobre el sustrato monocatenario (Fig 29B, calles 6-10). El tamaño de los fragmentos acumulados en la degradación por Spn PolI sobre el fragmento de 89 pb se centró en dos regiones de 41 a 52 nt y de 20-24 nt (Fig. 29 A y B). Se analizó el tamaño de los fragmentos generados que se acumulaban en la parte baja del gel. Estos se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 20% (Fig. 29C). Se observaron fragmentos de aproximadamente 20-24nt y en muy baja proporción oligonucleótidos de 10, 11, 12-mer (Fig. 29C, calles 1 y 2).

La acción exonucleásica 5'→ 3' de Spn PolI sobre los fragmento de 138 pb y 89 pb generó fragmentos de una determinada longitud. Se plantearon hipótesis alternativas que permitieran explicar la presencia de estos productos intermediarios. En primer lugar, se analizaron las secuencias de DNA de los extremos 5' de cada uno de los fragmentos obtenidos con los dos sustratos, y no se halló ninguna secuencia común en estos extremos. La segunda alternativa se basaba en la existencia de estructuras tallo-lazo, que impedirían la degradación exonucleolítica catalizada por Spn PolI. Las estructuras secundarias posibles encontradas en estos fragmentos poseían una energía libre muy baja, y era bastante improbable su formación. Además para descartar esta hipótesis se realizó un ensayo con el fragmento monocatenario de 138 nt. La hebra de DNA monocatenario fue calentada 10 minutos a 90°C y se incubó tiempos cortos con Spn PolI. Los productos de esta reacción seguían situándose entorno a las regiones de 36 a 47 nt y 20 a 27 nt (datos nos mostrados). Por lo tanto, no parecía posible que los



**Fig. 28.** Actividad exonucleásica de Spn PolI sobre un fragmento de DNA de 138 pb. El fragmento de 138 pb (66 fmol) marcado en el extremo 3' con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ddATP fue incubado con 0,4 U (A) y 0,1 U (B) de actividad exonucleásica de Spn PolI. Se incubó a 37 °C el enzima con el fragmento bicatenario (A y B, calles 1-5) o con el fragmento monocatenario, purificado como se indica en Métodos (A y B, calles 6-10). Se extrajeron alicuotas a distintos tiempos, 2,5 min (A y B, calles 1 y 6), 10 min (A y B, calles 2 y 7), 30 min (A y B, calles 3 y 8), 1h (A y B, calles 4 y 9) y 2 h (A y B, calles 5 y 10). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante al 8%. A la izquierda de la Fig. se indican las posiciones de los fragmentos.



**Fig. 29. Actividad exonucleásica de Spn Poll sobre un fragmento de DNA de 89 pb.** El fragmento de 89 pb (60 fmol) marcado en el extremo 3' con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ddATP fue incubado con 0,4 U (A y C) y 0,1 U (B) de actividad exonucleásica de Spn Poll. Se incubó a 37°C el enzima con el fragmento bicatenario (A y B, calles 1-5; C, calle 1) o con el fragmento monocatenario, desnaturalizado por calor (A y B, calles 6-10; C, calle 2). Se extrajeron alicuotas a distintos tiempos 2,5 min (A y B, calles 1, 6), 10 min (A y B, calles 2, 7), 30 min (A y B, calles 3, 8), 1h (A y B, calles 4, 9) y 2h (A y B, calles 5, 10; C, calles 1, 2). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante al 8% (A y B) y al 20% (C). A derecha e izquierda de la Fig. se indican las posiciones de los fragmentos.

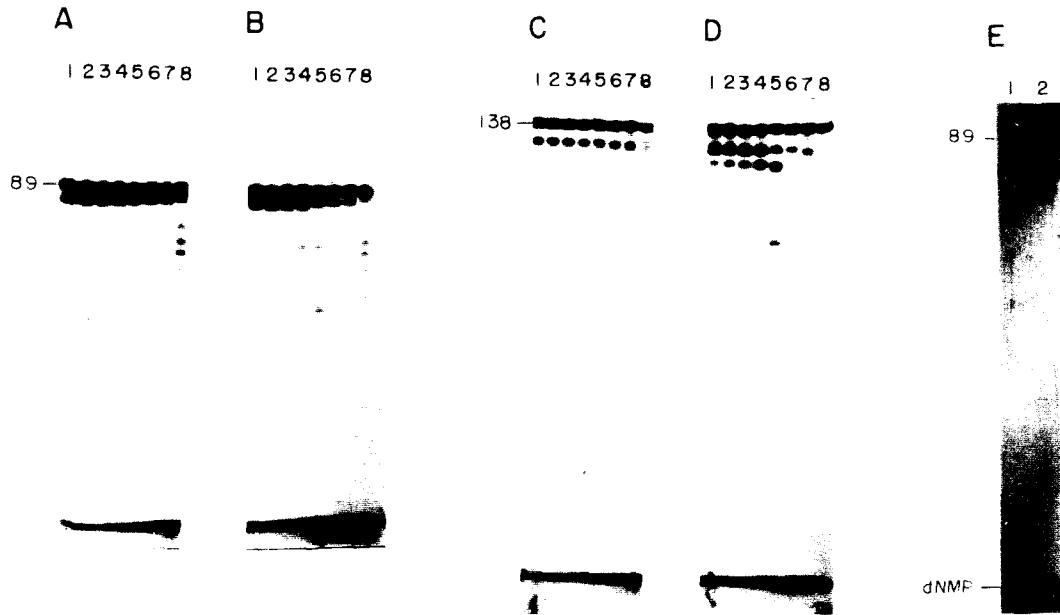
fragmentos obtenidos se produjeran por la existencia de estructuras secundarias en el DNA. La tercera y última alternativa, está relacionada con el tamaño de los productos obtenidos a partir de los fragmentos de 138 pb y 98 pb. Los fragmentos de DNA generados muestran un número de nucleótidos común, así se puede generalizar que los fragmentos poseen un tamaño de 20 a 24 nt y de 41 a 47 nt. La acumulación de fragmentos de una determinada longitud podría indicar una disminución de la afinidad del enzima por el sustrato a partir de una determinada talla (20 ó 25 nt).

Por último, se examinó la actividad exonucleasa 5'→3' de Eco PolI, sobre los dos fragmentos (89 pb y 138 pb) marcados en el extremo 3' con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ddATP (Fig. 30), se utilizaron 0,8 U de actividad exonucleasa de Eco PolI. Al igual que Spn PolI, este enzima ataca de forma preferencial los sustratos monocatenarios (Fig. 30B y D). El tamaño de los productos acumulados por Eco PolI fue similar a Spn PolI, pero el sustrato fue hidrolizado en una menor proporción. Se analizaron los productos de menor tamaño generados por Eco PolI en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 20% (Fig. 30E, calles 1 y 2). Se detectó la liberación de mononucleótido en la muestra con DNA monocatenario, a pesar de tener un dideoxinucleótido en su extremo 3', que inhibiría la actividad exonucleásica 3'→5', sobre DNA nativo no se observa ningún fragmento, probablemente los productos de reacción están distribuidos a lo largo del gel.

### **Estudio de la interacción de Spn PolI con DNA, en ensayos de retraso de migración en geles de poliacrilamida**

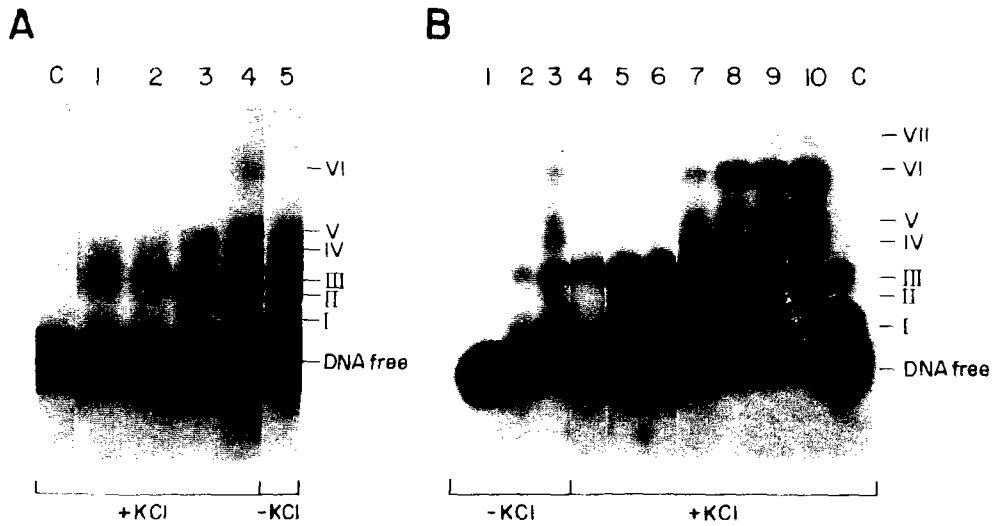
Se estudió la posible formación de complejos de DNA-proteína con un fragmento de 301 pb marcado radiactivamente en el extremo 3'. Este fragmento nativo (con extremos protuberantes 5') o desnaturizado fue incubado en distintas condiciones con Spn PolI y analizada su movilidad electroforética en geles al 5% de PAA, según se detalla en el apartado de Métodos. La reacción de unión de DNA-proteína contenía 0,47 ng de DNA nativo y 0,28  $\mu$ g de Spn PolI. La relación de moléculas de enzima/DNA fue aproximadamente de 1200/1.

El ensayo se realizó en presencia de Tris 10mM pH 7,6, albumina de suero bovino a 0,05 mg/ml y DTT 1mM, y se suplementó con distintos cationes divalentes (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CoCl<sub>2</sub>, 2 mM ZnCl<sub>2</sub>). Solamente en presencia de Mn<sup>+2</sup> se observó retraso del fragmento de DNA en el gel promovido por la unión de Spn PolI. En estas condiciones Spn PolIc269 (carente del dominio exonucleásico) no alteró la migración del DNA (datos no mostrados). La definición e intensidad de las bandas de DNA retrasadas, por unión de Spn PolI, fue mejorada por la adición de 50 mM KCl en el ensayo. En estas condiciones óptimas de retraso de migración del fragmento de DNA, se incorporaron cantidades crecientes de Spn PolI (6 x 10<sup>-1</sup> a 6 U de polimerasa) en el ensayo. La proporción de los complejos se modificó con la concentración de enzima, visualizándose 5 bandas de menor migración, denominadas complejos I, II, III, IV y V con 0,4 U de Spn PolI (Fig. 31A, calle 3). Se observó una 6<sup>a</sup>



**Fig. 30.** Actividad exonucleásica de Eco PolI sobre fragmentos de DNA de 89 y 138 pb. Los fragmentos de 89 pb (A, B, E) (45 fmol) y 138 pb (C y D) (80 fmol) marcados en el extremo 3' con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ddATP fueron incubados con 0,4 U (A y C) y 0,1 U (B) de actividad exonucleásica de Eco PolI. Se incubó a 37°C el enzima con el fragmento bicatenario (A y B, calles 1-5; C, calle 1) o con el fragmento monocatenario, desnaturalizado por calor (A y B, calles 6-10; C, calle 2). Se extrajeron alicuotas a distintos tiempos 2,5 min (A y B, calles 1, 6), 10 min (A y B, calles 2, 7), 30 min (A y B, calles 3, 8), 1h (A y B, calles 4, 9), 2h (A y B, calles 5, 10; C, calles 1, 2). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante al 8% (A y B) y al 20% (C). A derecha e izquierda de la Fig. se indican las posiciones de los fragmentos.





**Fig. 31. Retraso en la migración de un fragmento de 301 pb por interacción con Spn PolI.** (A) El fragmento bicatenario de 301 pb (2,4 fmol) se incubó a 20°C, 15 min en presencia de 5 mM MnCl<sub>2</sub> y KCl, según se indica en la Fig. con diferentes cantidades de Spn PolI 0,6, 1,2, 2,4, 6 y 6 U de actividad polimerásica (calles 1-5). (B) El fragmento monocatenario de 301 pb (2,4 fmol) desnaturalizado por calor se incubó en las mismas condiciones, en presencia de 5mM MnCl<sub>2</sub> y KCl, según se indica en la Fig. con diferentes cantidades de Spn PolI, calles 1 y 4, 0,018 U; 5, 0,037 U; 6, 0,075 U; 2 y 7, 0,15 U; 8, 0,3 U; 9, 0,6 U; 3 y 10, 1,2 U. La calle C, es una muestra de reacción sin enzima. Se indican a la izquierda de la Fig. con números romanos (I-VII) las posiciones de los complejos.

banda muy tenue, complejo VI con 1 U de Spn PolI (Fig. 31A, calle 4). Se puede visualizar el efecto positivo de KCl sobre el retraso del fragmento de DNA (Fig. 31A, calle 1-4). En un experimento similar realizado con DNA desnaturalizado y diferentes cantidades de enzima (1,2 a  $1,8 \times 10^{-2}$  U de polimerasa) (Fig. 31B) se observó un patrón de bandas similar en número y distribución a las detectadas con DNA bicatenario (aunque se advierte una 7ª banda muy tenue, complejo VII). Estas bandas presentaban una mayor intensidad y definición que las observadas con DNA bicatenario, aparentemente debido a una mayor afinidad del enzima por el sustrato monocatenario. El complejo VI visualizado con DNA monocatenario (Fig. 31B, calle 7) se observaba con 0,15 U, esta cantidad de enzima representa una relación de moléculas de Spn PolI a DNA de 190 a 1. Por el contrario con DNA nativo, solo se detectaba con 6 U, esta cantidad supone 7700 moléculas de Spn PolI por cada molécula de DNA (Fig. 31A, calle 4). Al igual que con DNA nativo la adición de KCl incrementaba la intensidad de los complejos (Fig. 31B, calles 1-3 frente calles 4, 7 y 10).

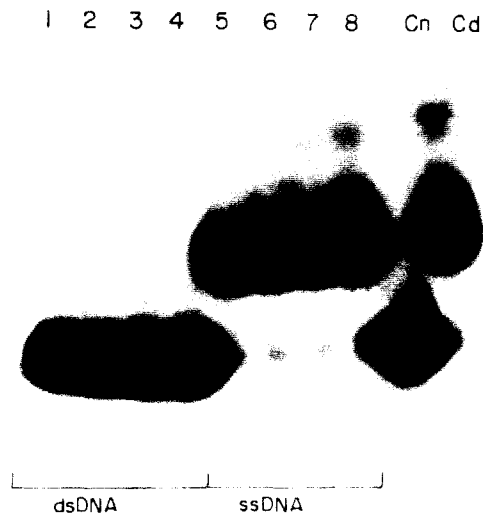
Se intentó observar retrasos en la migración de la banda de DNA nativo y desnaturalizado con Spn PolIc269 (12 U), modificándose las condiciones de incubación, combinando KCl con  $MgCl_2$ , o con  $MnCl_2$  (Fig. 32) pero en ninguna condición el DNA mostró diferente movilidad.

## PAPEL ESENCIAL DE POLI EN LA VIABILIDAD CELULAR DE *S.PNEUMONIAE*

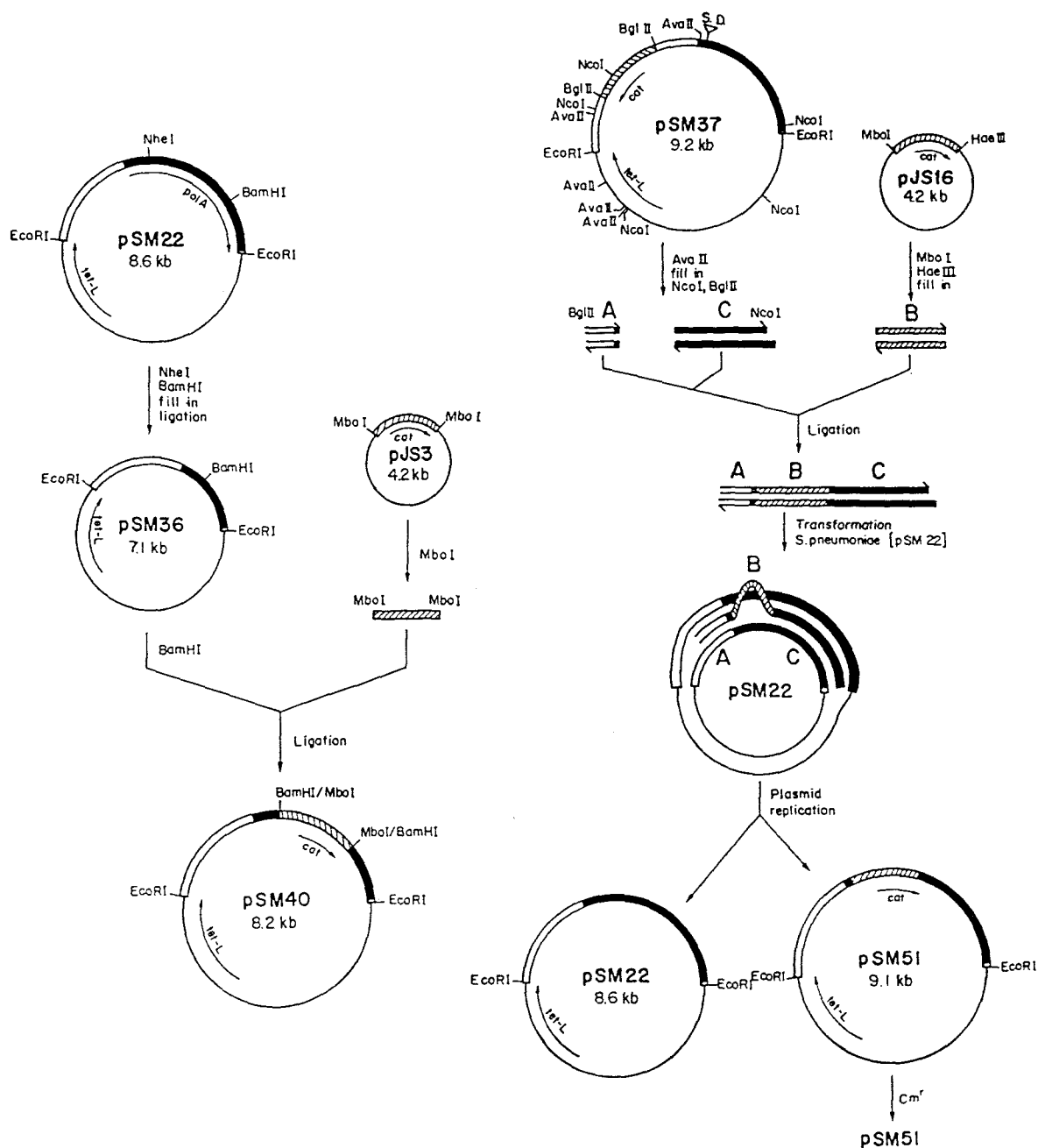
### Construcción de derivados de pSM22 utilizados en la transformación cromosómica de *S. pneumoniae*

Construimos nuevos derivados del gen *polA*, con el fin de obtener mutantes *polA* en *S. pneumoniae* por transformación cromosómica. Estos derivados fueron contruidos delecionando regiones centrales del gen *polA* y sustituyendo éstas con el gen *cat*. La disposición del marcador de resistencia a Cm flanqueado por secuencias adyacentes y homólogas al cromosoma de *S. pneumoniae* permitiría la obtención de mutantes *polA* en el cromosoma por selección de transformantes resistentes a Cm.

La construcción del plásmido pSM40 se realizó a partir del pSM22 (Fig. 33), por digestión con *NheI* y *BamHI*, relleno de los extremos cohesivos y circularización. El plásmido resultante, de 7,1 kb, se denominó pSM36 (Fig. 33) carente de los nucleótidos 376 a 1857 del gen *polA*. La ligación regeneró un sitio único *BamHI*, que fue empleado para introducir el gen *cat* contenido en un fragmento *MboI* (1,14 kb) de pJS3. El plásmido pSM40 construido contiene el gen *polA* $\Delta$ (376-1861bp) $\Omega$ (376::*cat*) (Fig. 34), que codificaría para un polipéptido de 14,7 kDa (PolIn125) carente de las dos actividades enzimáticas de Spn PolI. Además no esperabamos ningún producto con actividad polimerásica codificado por el extremo 3' del gen *polA* mutado,



**Fig. 32. Retraso en la migración de un fragmento de 301 pb por interacción con Spn PolIc269.** Se analizó el retraso en migración del fragmento de 301 pb (2,4 fmol) nativo (ds DNA) y desnaturalizado por calor (ssDNA), según se indica en la Fig. Se incubaron 12 U de actividad polimerásica de Spn PolIc269 en diferentes tampones de reacción, calles 1 y 5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 y 6, 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 50 mM KCl; 3 y 7, 5 mM MnCl<sub>2</sub>; 4 y 8, 5 mM MnCl<sub>2</sub>+50 mM KCl. Las calles Cn y Cd, son muestras sin enzima con DNA bicatenario y monocatenario, respectivamente.



**Fig. 33. Construcción de los plásmidos pSM40 y pSM51.** Los genes son transcritos en la dirección indicada por las flechas. Símbolos genéticos: *polA*, codifica Spn Poll; *tet-L*, codifica un producto responsable de la resistencia a Tc; *cat*, codifica el enzima CAT; S.D, sitio de unión a los ribosomas del gen 10 del fago T7. Segmento blanco, DNA de *S. pneumoniae*; segmento negro, gen *polA*; línea, vectores; segmento rayado, gen *cat*. En la parte superior izquierda, se muestra la estrategia seguida para la obtención del plásmido pSM40 a partir del plásmido parental pSM22. En la parte derecha se indican los plásmidos utilizados en la construcción del pSM51 y el mecanismo genético empleado. Solo se muestran sitios de restricción relevantes en las construcciones.

comenzando después de la fusión *cat-pola*, ya que no existe ninguna secuencia de unión a los ribosomas. Si a pesar de este hecho se sintetizará un polipéptido, a partir del primer codon de iniciación posible Val<sub>641</sub>, estaría desprovisto de la región amino terminal del dominio polimerasa de Spn PolI.

La construcción del plásmido pSM51 se realizó mediante el mismo mecanismo genético de transformación plasmídica (Lacks y cols, 1982) empleado en la construcción de los plásmidos pSM41 y pSM37. El plásmido pSM37 (Fig. 33) fue digerido con *AvaII* y, después de rellenar sus extremos 5' protuberantes, con *NcoI* y *BgIII*. Dos de los fragmentos de DNA generados fueron purificados: un fragmento *BgIII-AvaII* (Fig. 33, fragmento A) que contiene el promotor *pola* y un fragmento *NcoI-AvaII* (Fig. 33, fragmento C) que incluye el sitio de unión a los ribosoma y los 11 primeros codones del gen 10 de T7 (Studier y Moffat, 1986) en fase con el gen *pola* neumocócico desde el nucleótido 803. El plásmido pJS16 fue digerido con *MboI* y *HaeIII*, se rellenaron los extremos protuberantes, y se purificó un fragmento de 1043 pb (Fig. 33, fragmento B). Este fragmento de DNA contiene el gen *cat* de pC194 truncado en el codon 629 (Horinouchi y Weisblum, 1982), bajo el control del promotor *tet-L* de pLS1. El fragmento B de extremos romos fue ligado a los fragmentos A y C, y la mezcla de ligación se utilizó para transformar la estirpe *S. pneumoniae* 708[pSM22]. Los transformantes fueron seleccionados por resistencia a Cm y Tc. Algunos transformantes contenían un plásmido del tamaño esperado, 9,2 kb, uno de ellos fue denominado pSM51 (Fig. 33), pero la mayoría contenían plásmidos delecionados. Teóricamente, esta construcción generaría una fusión en fase entre el gen *cat*, que carece de 6 codones del extremo carboxilo-terminal y el gen *pola* desde el codon 27. Esta fusión codificaría un polipéptido CAT con 42 residuos anormales en el extremo carboxilo. El análisis de la secuencia de DNA de la fusión de los genes *cat* y *pola* del plásmido pSM51, reveló la ausencia de dos residuos G de la secuencia AGGGACC, esperada de la ligación de extremos romos de los sitios *HaeIII* y *AvaII*. Como consecuencia el gen *cat* mutante codificaría una proteína CAT con 3 aminoácidos anormales (Arg-Pro-Phe) en su extremo carboxilo, que aparentemente no interfieren en la expresión del marcador antibiótico en *S. pneumoniae*. El plásmido pSM51 contiene el gen *pola*Δ(184-803bp)Ω(81::cat)Ω(184::pET-3b'[591-511bp])(Fig. 34). La proteína codificada por este gen mutante es de 71 kDa, idéntica a la expresada a partir del plásmido pSM37 (véase Fig. 17B), con únicamente actividad polimerásica y que se denominó PolIc269 (véase Fig. 16).

### Transferencia de mutaciones *pola* al cromosoma de la estirpe de *S. pneumoniae* 641

Para examinar el posible requerimiento de Spn PolI para la viabilidad celular de *S. pneumoniae*, se transformó el cromosoma de *S. pneumoniae* con los insertos cromosómicos presentes en los plásmidos pSM29, pSM28, pSM40, pSM41 y pSM51. El mapa lineal de dichos insertos conteniendo genes mutantes *pola* se indica en la Fig. 34.

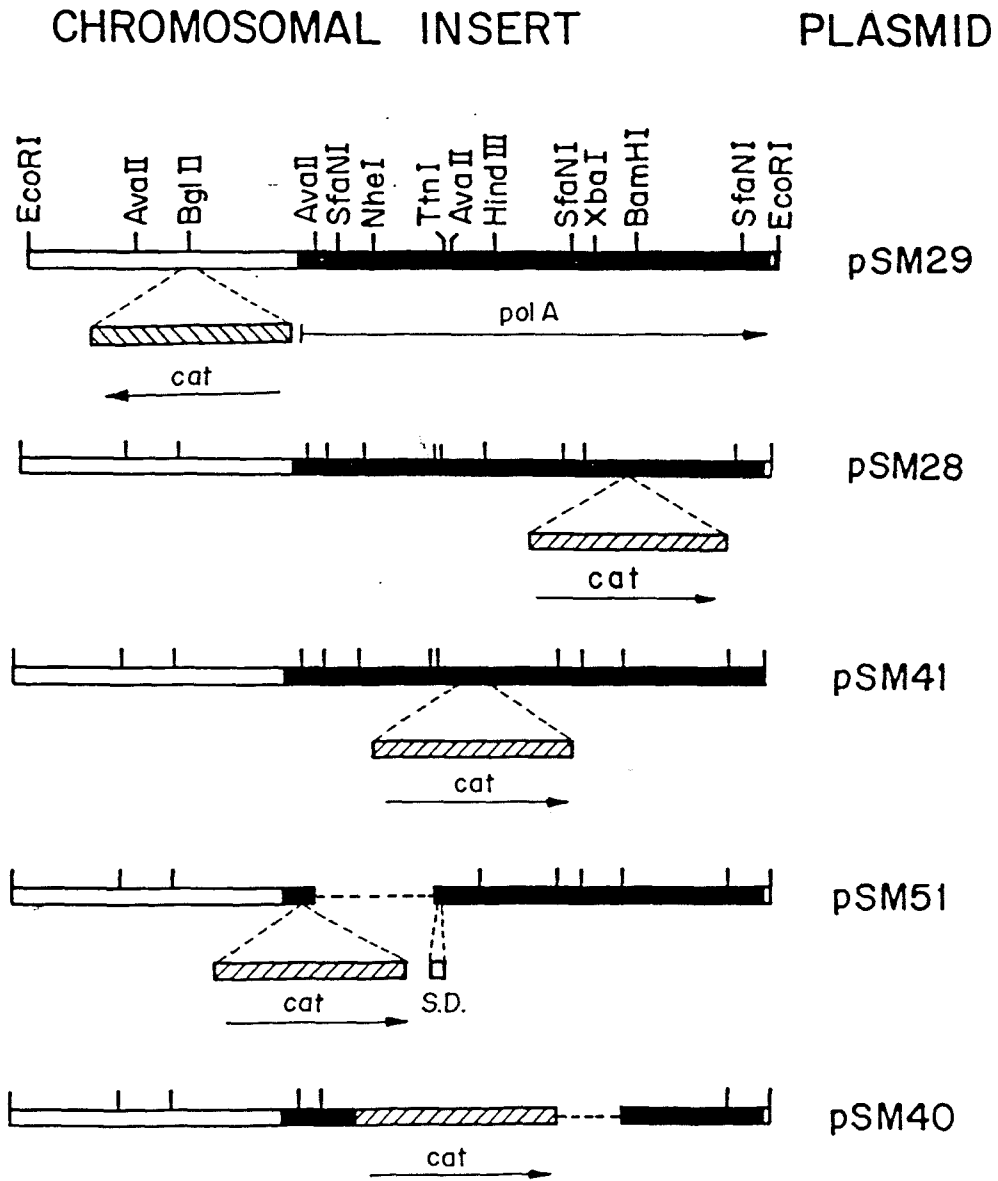


Fig. 34. Mapas físicos de los insertos cromosómicos de plásmidos que contienen genes *polA* silvestres y mutantes. Los genes son transcritos en las direcciones indicadas por las flechas. Símbolos genéticos: *polA*, codifica Spn PolI; *cat*, codifica el enzima CAT; S.D., sitio de unión a los ribosomas para la traducción del gen 10 de T7. Las deleciones dentro del gen *polA* son representadas por líneas discontinuas. Se señalan unicamente los sitios de restricción utilizados en las distintas construcciones.

Se intentó eliminar el dominio de actividad polimerasa de Spn PolII mediante transformación con los insertos de los plásmidos pSM41 y pSM28. Así mismo, se pretendía eliminar el dominio de actividad exonucleásica por introducción en el cromosoma del inserto del plásmido pSM51. Finalmente, la transformación con el inserto del plásmido pSM40 debería generar un gen *polA* que codificaría para un polipéptido carente de actividades enzimáticas. Los resultados de estas transformaciones se recogen en la Tabla X, es de destacar la baja frecuencia de transformación con los insertos de los plásmidos pSM40 y pSM51 ( $1,7 \times 10^{-5}$  y  $6,3 \times 10^{-5}$ , respectivamente) y la introducción en el cromosoma de los genes *polA* mutantes de los plásmidos pSM41 y pSM28, con aproximadamente la misma eficiencia que el gen *polA* silvestre presente en pSM29. Estos resultados demuestran la dispensabilidad del dominio polimerasa de Spn PolII para la supervivencia celular. Se analizó por hibridación mediante Southern el DNA cromosómico de las estirpes de *S. pneumoniae* MP541 y MP551 que carecen en su cromosoma del extremo 3' del gen *polA* y contienen los insertos cromosómicos de los plásmidos pSM28 y pSM41, respectivamente. En la Fig. 35A<sub>1</sub> se muestra el patrón de digestión del DNA cromosómico de la estirpe MP541 digerido con *EcoRI* (calle 2) y con *EcoRI*, *HindIII* (calle 3). La sonda utilizada en este experimento fue el plásmido pJS3 marcado radiactivamente. Este plásmido presenta en común con los DNA analizados el gen *cat* y el vector pLS1, por lo tanto detectaremos fragmentos que contengan estas secuencias. Se observa un fragmento *EcoRI* de 5,3 kb (calle 2) y un fragmento *EcoRI-HindIII* de 2,7 kb. Estos fragmentos se generan por la introducción del gen *cat* de pJS3 en el sitio *BamHI* (coordenada 1861 del gen *polA*) (Fig. 35A<sub>2</sub>). Utilizamos como control en este experimento el plásmido pSM28 digerido con *EcoRI* y *EcoRI*, *HindIII* (calles 1 y 4). Mediante la misma técnica se analizó la mutación *polA* de la estirpe MP551. Se digirió el DNA cromosómico de la estirpe mutante y silvestre con *NcoI*. En el DNA de la estirpe silvestre se detectó un fragmento de 3,3 kb (Fig. 35B<sub>1</sub>, calle 3). Este fragmento fue sustituido por dos fragmentos de 2,7 y 1,8 kb en el DNA de la estirpe MP551 (calle 2), debido a la inserción del gen *cat* que contienen un sitio *NcoI* (coordenada 432, Horinouchi y Weisblum, 1982) (Fig. 35B<sub>2</sub>). Como control en este experimento se utilizó el plásmido pSM22 digerido con *EcoRI*, *HindIII* (Fig. 35B<sub>1</sub>). La sonda empleada en esta hibridación fue el plásmido pSM29 marcado no radiactivamente con el kit de Bohringer.

Así mismo, se analizó el DNA cromosómico de alguno de los clones obtenidos en las transformaciones con los insertos de los plásmidos pSM40 y pSM51 por hibridación mediante el método de Southern, detectándose la presencia de rearrreglos o duplicaciones en la región *polA*, que permitían mantener una copia silvestre del gen *polA* (dato no mostrado).

Estos resultados indicaban que no era posible delecionar el extremo 5' del gen *polA*, y sugerían el requerimiento de la actividad exonucleásica de Spn PolII para la viabilidad celular de *S. pneumoniae*.

La estirpe receptora 641 utilizada en los experimentos de transformación era parcialmente deficiente en las nucleasas mayoritarias de *S. pneumoniae*, exonucleasa y

**Tabla X:** Transformación cromosómica de la estirpe *S. pneumoniae* 641 con derivados del gen *polA*<sup>a</sup>

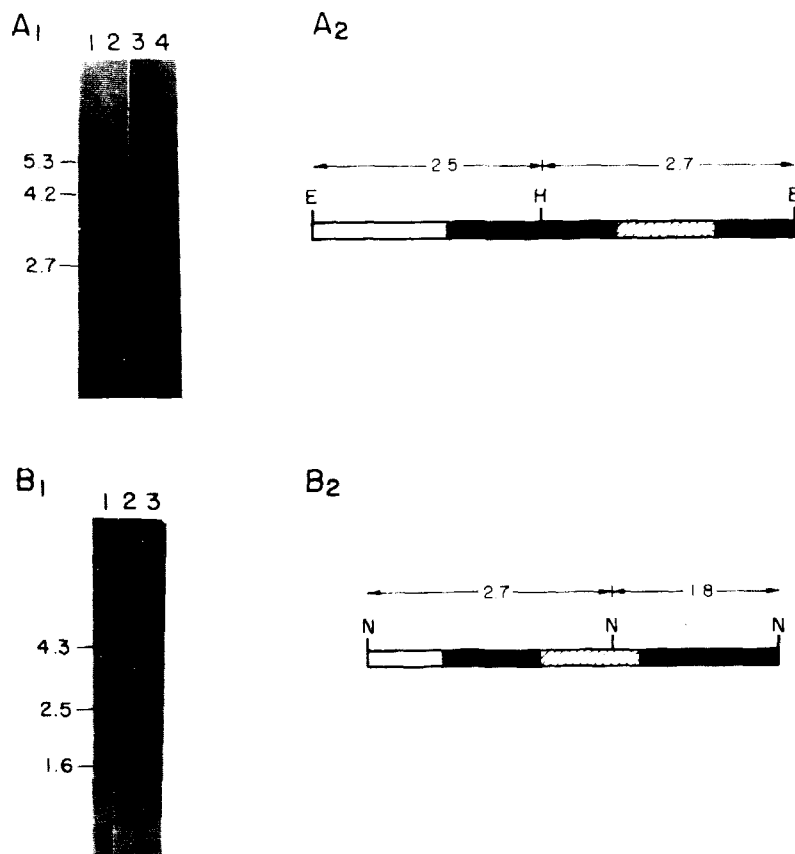
DNA donador <sup>b</sup>	Transformantes/ml		Frecuencia de transformación <sup>c</sup> (%)
	Cm <sup>r</sup>	Sm <sup>r</sup>	
pSM28 (Exo <sup>+</sup> Pol <sup>-</sup> )	370.000		0,90
pSM29 (Exo <sup>+</sup> Pol <sup>+</sup> )	450.000		1,09
pSM40 (Exo <sup>-</sup> Pol <sup>-</sup> )	7		0,000017
pSM41 (Exo <sup>+</sup> Pol <sup>-</sup> )	690.000		1,68
pSM51 (Exo <sup>-</sup> Pol <sup>+</sup> )	26		0,000063
R6		7.700	0,02

<sup>a</sup> 2,5 µg de DNA plasmídico digerido con *EcoRI* y *PstI* ó 1 µg de DNA cromosómico fueron utilizados para transformar 1 ml de cultivo competente como se describe en el apartado de Métodos

<sup>b</sup> Excepto para R6, que se transformó con DNA cromosómico, los otros DNAs fueron plásmidos digeridos. Los insertos cromosómicos de estos plásmidos contienen distintos alelos *polA*, que confieren los fenotipos indicados entre paréntesis

<sup>c</sup> La frecuencia de transformación se calculó refiriendo los transformates/ml obtenidos con cada uno de los DNAs al número de viables totales del cultivo competente ( $4,1 \times 10^7$  bacterias/ml).





**Fig. 35. Caracterización física de la región *polA* en las estirpes mutantes *S. pneumoniae* MP541 y MP551. (A<sub>1</sub>) Hibridación del plásmido pJS3 con el DNA cromosómico de la estirpe MP541 digerido con *EcoRI* (calle 2) y *EcoRI* y *HindIII* (calle 3). Estandar de peso molecular, plásmido pSM28 digerido con *EcoRI* (calle 1) ó *EcoRI* y *HindIII* (calle 4). El tamaño de los fragmentos en kb se indica a la izquierda de la Fig. (A<sub>2</sub>) Mapa físico de la región *polA* del cromosoma de *S. pneumoniae* MP541. Se indica la secuencia de los genes a partir de la hibridación del Southern, y las distancias entre los sitios de restricción predichos a partir del mapa de restricción de pSM28. (B<sub>1</sub>) Hibridación del plásmido pSM29 con el DNA cromosómico de las estirpes MP551 y 641 digerido con *NcoI* (calle 2 y 3). Calle 1, plásmido pSM22 digerido con *EcoRI* y *HindIII*, el tamaño de los fragmentos en kb se indica a la izquierda de la Fig. (B<sub>2</sub>) Mapa físico de la región *polA* del cromosoma de *S. pneumoniae* MP551. Se indica la secuencia de genes a partir de la hibridación de Southern, y las distancias entre los enzimas de restricción analizados son estimadas de los datos de secuencia del gen *polA* y del gen *cat*. Los segmentos de (A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>) representan: gen *polA*, segmento negro; DNA cromosómico entorno al locus *polA*, segmento blanco; gen *cat*, segmento rayado. Los sitios de restricción, H:*HindIII*, E:*EcoRI*, N:*NcoI*.**

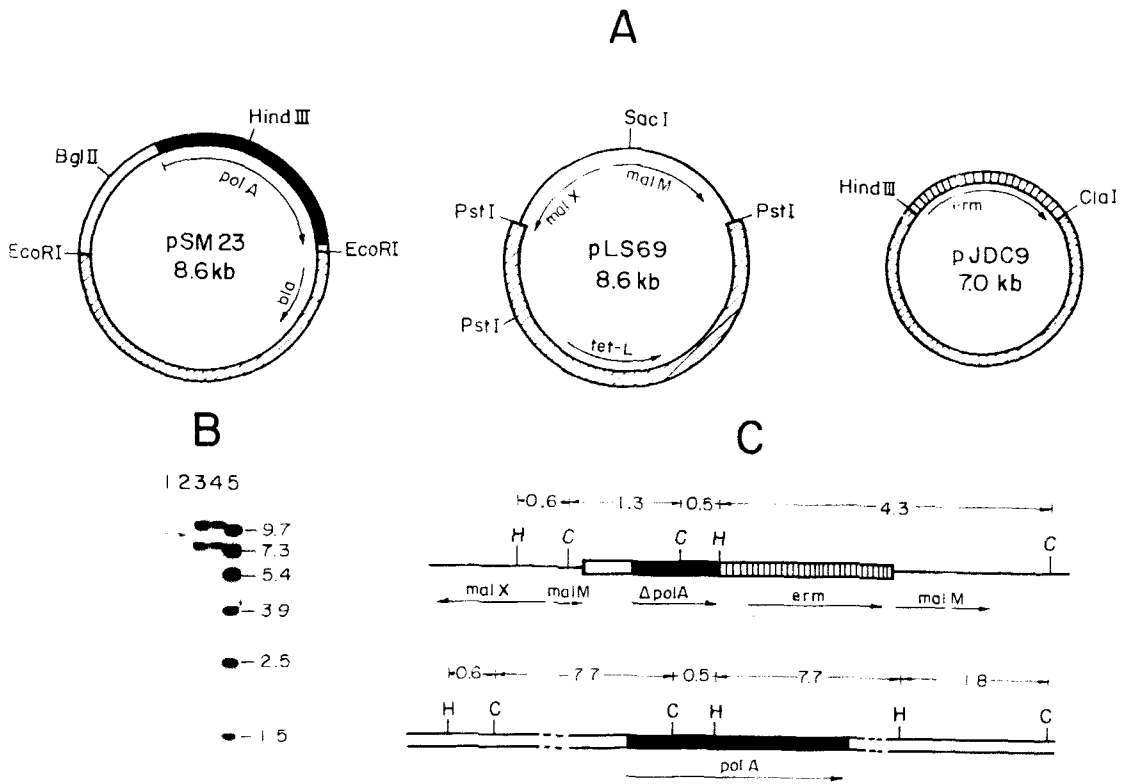
endonucleasa (Lacks y cols, 1975). Este hecho podría ser la causa de los resultados negativos. Para eliminar esta posibilidad se intentó eliminar el dominio de actividad exonucleásica utilizando la estirpe R61 como receptora, obteniéndose un resultado similar al mostrado en la Tabla X (datos no mostrados).

Por otra parte, modificamos las condiciones de crecimiento celular después de la transformación sustituyendo la sacarosa por glucosa, como fuente de carbono, para aumentar el tiempo de división celular, y favorecer la supervivencia de los transformantes. El tiempo de división celular se duplicó en estas condiciones, pero tampoco se consiguieron aislar transformantes con el gen *polA* alterado. Estos resultados apoyaban la hipótesis: la actividad exonucleásica de Spn PolI es esencial para la supervivencia celular de *S. pneumoniae*, al no poder ser sustituida su función *in vivo* por otra proteína celular.

### **Integración ectópica del extremo 5' del gen *polA* en el cromosoma de *S. pneumoniae***

La incapacidad de introducir en el cromosoma de *S. pneumoniae* formas mutantes del gen *polA* defectivas en el dominio exonucleásico de Spn PolI podría ser justificada simplemente por la ausencia del proceso recombinacional requerido. Esta hipótesis era poco probable, ya que en el mismo locus *polA* se había conseguido introducir otros alelos. Para descartar esta alternativa, desarrollamos un sistema para detectar dichos eventos recombinacionales, como se detalla seguidamente.

Construimos una nueva estirpe *S. pneumoniae* MP555, que posee en su cromosoma un gen *polA* silvestre y un fragmento *BglIII-HindIII* de 1,3 kb, que contienen el extremo 5' del gen *polA*, integrado ectópicamente en el locus *malM*. En la Fig. 36A se muestran los plásmidos utilizados en la construcción de la estirpe MP555: pSM23, pLS69 y pJDC9. El plásmido pSM23 se digirió con *HindIII* y *BglIII*, se purificó un fragmento de 1,3 kb que contiene el promotor y el extremo 5' del gen *polA* que codifica para el dominio exonucleasa. Este DNA se ligó al fragmento *HindIII-ClaI* de 2,1 kb del plásmido pJDC9, que contiene el gen de resistencia a eritromicina *ermB*. Posteriormente se digirió la mezcla de ligación con *BglIII*, para eliminar formas circulares y se rellenaron los extremos cohesivos del DNA. El plásmido pLS69, que contiene el gen *malM*, fue linearizado con *SacI* y tratado con nucleasa mung bean. Este DNA se incorporó a la anterior mezcla de ligación (extremo 5' *polA-ermB*), y tras tratamiento con DNA ligasa, la muestra fue digerida con *PstI*, para impedir el establecimiento plasmídico durante la transformación. El resultado de la transformación de la estirpe 641 (por selección a Em<sup>r</sup>) sería introducir en su cromosoma, en el sitio *SacI* del gen *malM*, el extremo 5' del gen *polA* y el marcador antibiótico de resistencia a Em. La nueva estirpe se denominó MP555, por hibridación de Southern se analizaron los loci *malM* y *polA* presentes en el DNA cromosómico de esta estirpe. En la figura 36B se muestran los patrones de digestión del DNA cromosómico de la estirpe parental 641 (calles 1 y 3) y MP555 (calles 2 y 4) con *HindIII* (calles 1-2) y *ClaI*



**Fig. 36. Construcción y caracterización de la estirpe *S. pneumoniae* MP555.** (A) Mapa físico de pSM23, pLS69 y pJDC9. (B) Hibridación de pSM41 con el DNA cromosómico de las estirpes *S. pneumoniae* 641 (calles 1 y 3), y MP555 (calles 2 y 4). El DNA cromosómico fue digerido con *HindIII* (calles 1 y 2) y *ClaI* (calles 3 y 4). Calle 5, mezcla de fragmentos utilizados como estandar de los plásmidos pSM29 digerido con *BamHI*, pJS37 digerido con *EcoRI*, pSM28 digerido con *EcoRV*, y pLS1 digerido con *AvaII* y *BglII*. El tamaño de los fragmentos en kb es indicado a la derecha de la Fig. (C) Mapa físico de las regiones *mal* y *polA* de la estirpe *S. pneumoniae* MP555. La disposición de los genes se determinó mediante hibridación de Southern, y las distancias entre los sitios de restricción analizados son predichos a partir de los mapas de restricción de los plásmidos. Los segmentos de (A y C) representan locus *polA*, segmento negro; región adyacente al gen *polA*, segmento blanco; región *mal*, línea; segmento rayado vertical, gen *ermB* que codifica para resistencia a Em; segmento rayado diagonal, vectores. gen  $\Delta polA$  codifica para Spn PolIn351a. Solo se indican los sitios de restricción relevantes, C: *ClaI*, H: *HindIII*.

(calles 3-4). Los fragmentos obtenidos por digestión del DNA de la estirpe MP555 coinciden con los tamaños esperados de la integración ectópica del gen *polA* en el locus *malM* (Fig. 36C, parte superior) y mantiene una copia del gen *polA* silvestre (Fig. 36C, parte inferior). Los sitios *ClaI* y *HindIII* fueron situados en el locus *malM* por los datos de secuencia de Lacks y cols (1982). La localización de los sitios de restricción externos al locus *polA* fue posible por otros datos no mostrados.

Con el fin de analizar la fusión génica *polA-ermB* introducida en el locus *malM* de la estirpe MP555 se construyó el plásmido pSM42. El DNA cromosómico de dicha estirpe se digirió con el enzima *ClaI*, este DNA conteniendo un fragmento de 4,8 kb fue ligado al plásmido pUC19 linearizado en el sitio *AccI*. Se transformó con esta mezcla de ligación la estirpe *E. coli* MC1061, aislándose un clon que contenía un plásmido de 7,8 kb, denominado pSM42. Se determinó la secuencia de nucleótidos del DNA en la región *polA-ermB*. No se detectó la aparición de rearrreglos durante la construcción de la estirpe (resultados no mostrados). Por tanto, la estirpe MP555 posee un gen *polA* silvestre, y un gen *malM* interrumpido por el extremo 5' del gen *polA* y el gen *ermB*. El producto esperado de la fusión *polA-ermB* es un polipéptido de 42,6 kDa denominado Spn PolI351b.

### **Transferencia de mutaciones *polA* al cromosoma de la estirpe de *S. pneumoniae* MP555**

Los DNA donadores empleados en las transformaciones de la estirpe MP555 fueron los mismos que los utilizados anteriormente con la estirpe 641. En la Fig. 34 se muestra el mapa lineal de los insertos cromosómicos de los plásmidos donadores pSM28, pSM29, pSM40, pSM41 y pSM51. Los datos de transformación se recogen en la Tabla XI e indican que en esta estirpe MP555 es posible deleccionar cualquiera de los dominios de actividad enzimática de forma independiente o eliminar integralmente el gen *polA*. Las diferencias que observamos en los niveles de transformación con cada uno de los insertos es debida a la extensión de la homología existente, a ambos lados del marcador antibiótico, entre el DNA donador y el cromosoma bacteriano, que permite una distinta frecuencia recombinacional. De esta forma se construyeron nuevas estirpes denominadas MP557, MP558 y MP560 a partir de la transformación con los insertos de los plásmidos pSM41, pSM40 y pSM51, respectivamente. Se analizó la integridad de las construcciones mediante digestión del DNA cromosómico con *EcoRI* (Fig. 37A, calles 1-6) y *PvuII* (calles 7-12) y posterior hibridación mediante el método de Southern. En todos los derivados del gen *polA* el tamaño de los fragmentos se correspondía con el mapa de restricción esperado de los datos de secuencia (Fig. 37B). Este análisis nos permitió comprobar que la integración ectópica del dominio 5' del gen *polA* y *ermB* en el locus *malM*, presente en la estirpe parental MP555, no había sido alterada durante el proceso de transformación. De los datos presentados en la Fig. 37A también se infirió el mapa de la región *mal* de

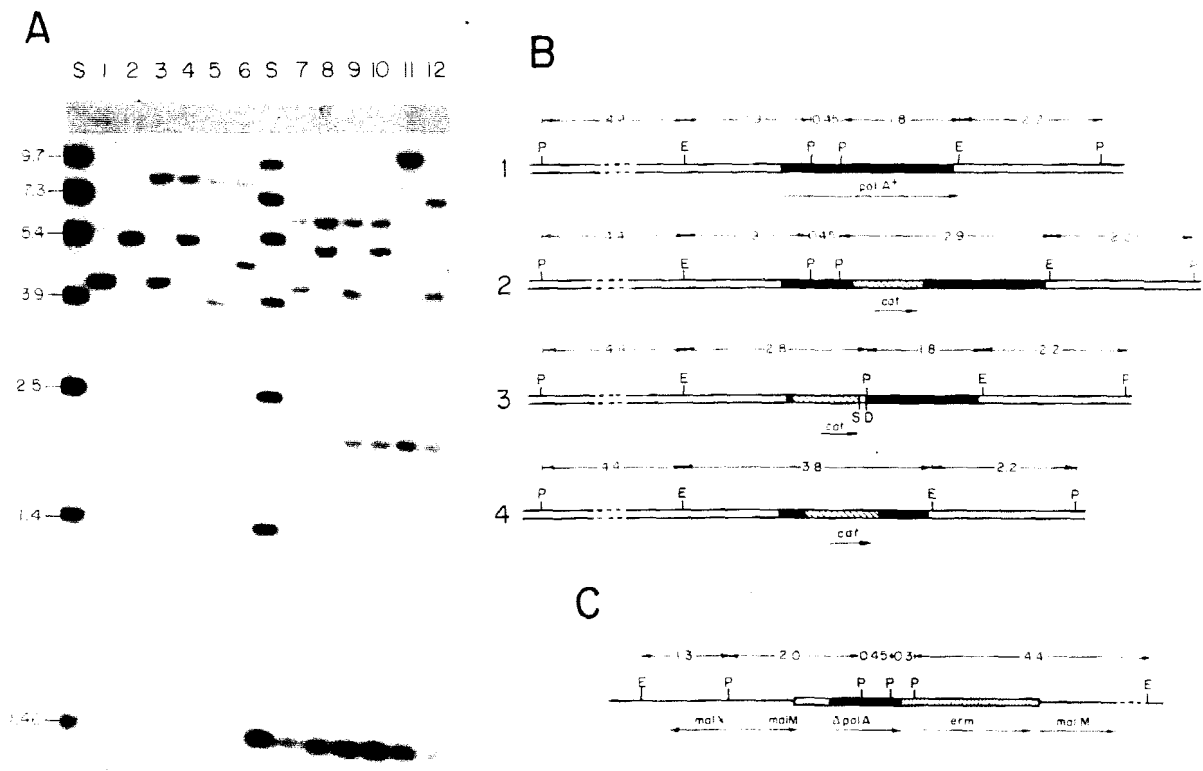
**Tabla XI:** Transformación cromosómica de la estirpe *S. pneumoniae* MP555 con derivados del gen *polA*<sup>a</sup>

DNA donador <sup>b</sup>	Transformantes/ml		Frecuencia de transformación <sup>c</sup> (%)
	Cm <sup>r</sup>	Sm <sup>r</sup>	
pSM28 (Exo <sup>+</sup> Pol <sup>r</sup> )	410.000		0,98
pSM29 (Exo <sup>+</sup> Pol <sup>+</sup> )	390.000		0,93
pSM40 (Exo <sup>-</sup> Pol <sup>r</sup> )	290.000		0,69
pSM41 (Exo <sup>+</sup> Pol <sup>r</sup> )	830.000		1,98
pSM51 (Exo <sup>-</sup> Pol <sup>+</sup> )	1.000.000		2,38
R6		4.200	0,01

<sup>a</sup> Condiciones experimentales idénticas a las indicadas en la Tabla X

<sup>b</sup> Se utilizaron los mismos DNAs donadores que en la Tabla X

<sup>c</sup> El número de viables del cultivo competente fue  $4,2 \times 10^7$



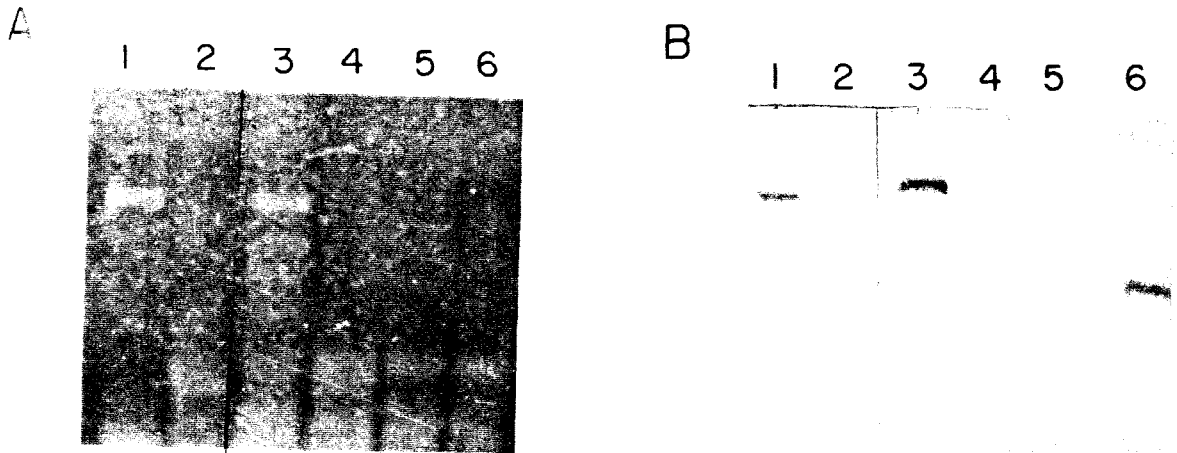
**Fig. 37. Caracterización física de las regiones *polA* y *mal* del cromosoma de las estirpes mutantes *polA* de *S. pneumoniae*.** (A) Hibridación con la sonda radiactiva, preparada a partir de pSM41, del DNA cromosómico de las estirpes *S. pneumoniae*: 641 (calles 1 y 7), MP551 (calles 2 y 8), MP555 (calles 3 y 9), MP557 (calles 4 y 10), MP558 (calles 5 y 11), MP560 (calles 6 y 12). El DNA cromosómico fue digerido con *EcoRI* (calles 1-6) y *PvuII* (calles 6-12). S: fragmentos de DNA estándar como en Fig. 36, se indican a la izquierda el tamaño de éstos en kb. (B) Mapa físico de la región *polA* del DNA cromosómico en las estirpes *S. pneumoniae*: 641 y MP555 (B1), MP551 y MP557 (B2), MP560 (B3) y MP558 (B4). (C) Mapa físico de la región *mal* del DNA cromosómico de las estirpes MP555, MP557, MP558 y MP560. La disposición de los genes se determinó mediante hibridación por el método de Southern, las distancias entre los sitios de restricción inferidos a partir de los mapas de restricción de los plásmidos. Solo se indican los sitios de restricción relevantes, E:*EcoRI*, P:*PvuII*. Los segmentos de (B) y (C) están descritos en la Fig. 36, excepto que el segmento rayado diagonal, corresponde al gen *cat*, que codifica para CAT.

las estirpes MP557, MP558 y MP560 mostrado en la Fig. 37C. Estos resultados permitieron demostrar que unicamente se puede conseguir la supervivencia de *S. pneumoniae* que contenga una deleción del extremo 5' del gen *polA*, cuando el dominio que confiere actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI es suplementado en *trans*, sugiriendo una función esencial del dominio exonucleásico de Spn PolI en la viabilidad celular de *S. pneumoniae*.

### Detección y cuantificación de los productos codificados por los genes *polA* alterados

Extractos crudos de distintas estirpes de *S. pneumoniae* fueron fraccionados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, después de eliminar el SDS mediante lavados sucesivos, se procedió a la detección *in situ* de las actividades nucleásicas (Fig. 38A) y polimerásica (Fig. 38B). Se visualizó en las muestras de las estirpes 641 y MP555 una banda a la posición de 99 kDa, correspondiente a Spn PolI silvestre con ambas actividades enzimáticas (Fig. 38A y B, calles 1 y 3). Spn PolIn351a, un polipéptido de 40,6 kDa que contiene el dominio exonucleásico 5'→3' fue detectado por su actividad nucleasa en las estirpes MP551 y MP557 (Fig. 38A, calles 2 y 4). Mediante polimerización *in situ* se detectó en la estirpe MP560 la sustitución de Spn PolI por PolIc269, un polipéptido de 71 kDa que contiene el dominio polimerizante de Spn PolI (Fig. 38B, calle 6). Una banda de actividad nucleásica (42,6 kDa) correspondiente a Spn PolIn351b, el producto esperado de la fusión génica *polA-ermB*, fue detectada en los extractos de las estirpes MP555, MP557, MP558, MP560 (Fig. 38A, calles 3-6). El producto de proteólisis con actividad nucleásica (de aproximadamente 32 kDa de masa molecular) generado a partir de Spn PolI conteniendo su extremo amino terminal, fue observado en todos los extractos (indicado como a en la Fig. 38A).

Finalmente, realizamos una valoración cuantitativa de la actividad polimerásica presente en los extractos crudos de las estirpes 641, MP551, MP555, MP557, MP558, MP560 (Tabla XII). Como era de esperar las estirpes que presentan un gen *polA* silvestre (641, MP555), codifican una proteína con actividad polimerásica normal. En las estirpes en las que se ha delecionado el dominio con actividad polimerásica (MP551, MP557, MP558), hay un descenso de 20 veces en actividad, respecto al nivel detectado en la estirpe silvestre. Y por último, en la estirpe MP560, hay una reducción al 20% en la actividad polimerásica. Estos ensayos nos permiten asegurar que las mutaciones introducidas en el gen *polA*, generan unos productos que enzimáticamente se comportan de acuerdo a las construcciones realizadas, verificadas por la hibridación mediante el método de Southern.



**Fig. 38.** Ensayo de detección de actividad nucleásica (A) y polimerásica (B) *in situ*. Extractos de las estirpes *S. pneumoniae* 641 (calle 1), MP551 (calle 2), MP555 (calle 3), MP557 (calle 4), MP558 (calle 5) y MP560 (calle 6), conteniendo 50  $\mu\text{g}$  de proteínas fueron analizados en SDS-PAGE al 10% de PAA, conteniendo en la matriz DNA de esperma de salmon: marcado radiactivamente con [ $^{35}\text{S}$ - $\alpha$ ]dATP (A) ó activado por tratamiento con DNasaI (B). Después de la electroforesis los gels fueron desarrollados para detectar actividades enzimáticas, como se indica en métodos, secados y autorradiografiados, excepto el gel de nucleasas que fue fluorografiado. Las posiciones de PolI y sus derivados son indicadas; (a) el producto pequeño de proteólisis de Spn PolI.

**Tabla XII:** Actividad polimerásica de distintas estirpes de *S. pneumoniae*

Estirpes	Actividad polimerásica* (U/mg prot.)
641	24,0
MP551	1,2
MP555	23,4
MP557	1,4
MP558	1,1
MP560	5,0

\* La actividad polimerásica se determinó como se indica en el apartado de Métodos



## FUNCION DEL DOMINIO POLIMERASA DE SPN POLI EN EL ESTABLECIMIENTO Y REPLICACION DE PLASMIDOS

### Transferencia de plásmidos con origen de replicación de pLS1 a estirpes deficientes en actividad polimerásica de Spn PolI

Analizamos en estirpes deficientes en la actividad polimerásica de Spn PolI, el establecimiento de los plásmidos pLS1 (Stassi y cols, 1981) y su derivado pLS5, de mayor número de copias (Lacks y cols, 1986), así como, del plásmido recombinante pLS86, que contiene un inserto de 5,2 kb del cromosoma de *S. pneumoniae* incluyendo el operon *sul* implicado en la biosíntesis del ácido fólico (López y cols, 1984b). Las estirpes receptoras utilizadas en estas transformaciones codifican distintos derivados Spn PolI: 641, Spn PolI; MP555, Spn PolI y Spn PolIn351b; MP541, Spn PolIn620; MP551, Spn PolIn351a; y MP560 Spn PolIc269 y Spn PolIn351b. Los transformantes fueron seleccionados por resistencia a Tc, marcador plasmídico. La eficiencia total de la transferencia plasmídica, en las distintas estirpes de *S. pneumoniae* (PI/Cr), fue calculada teniendo en cuenta los niveles de competencia establecidos por transformación cromosómica. Así mismo, se calculó la eficiencia de transferencia plasmídica relativa de las estirpes *polA* mutantes dividiendo la eficiencia total de cada una de ellas por la obtenida con la estirpe 641 (*polA*<sup>+</sup>) y expresado en porcentaje. En la Tabla XIII se indican los resultados obtenidos en estas transformaciones. En las estirpes mutantes (MP551, MP541), que poseen una proteína Spn PolI sin actividad polimerásica, no se detectó el establecimiento de los plásmidos vectores pLS1 y pLS5. Sin embargo, el plásmido pLS86 que presenta secuencias homólogas con el cromosoma de *S. pneumoniae*, fue capaz de establecerse con una eficiencia 5 veces inferior a la detectada en la estirpe control 641.

En la estirpe MP560 (Tabla XIII), que muestra una reducida actividad polimerásica, los plásmidos pLS1 y pLS5 se establecieron con una eficiencia de un 9 y 7%, respectivamente, en relación a la estirpe 641, siendo mayor la eficiencia (60%) si el DNA donador era el plásmido recombinante pLS86. La estirpe MP555 que expresa Spn PolI silvestre y un derivado con actividad exonucleásica (Spn PolIn351b) mostró una ligera disminución en los niveles de transformación con los plásmidos pLS1 y pLS5, respecto a la estirpe 641, estableciéndose sin dificultad el plásmido pLS86.

Los datos presentados en la Tabla XIII muestran el requerimiento de la actividad polimerásica de Spn PolI para el establecimiento de plásmidos con el replicón de pLS1. Sin embargo, los resultados obtenidos con el plásmido recombinante pLS86 indican que la presencia de secuencia homólogas con el cromosoma de *S. pneumoniae* obvian parcialmente el requerimiento de la actividad polimerásica de Spn PolI en dicho proceso. Para confirmar esta última hipótesis se analizó el establecimiento plasmídico en la estirpe MP541 de tres plásmidos recombinantes pSM22 (Fig. 7), pLS69 (Fig. 36A) y pLS83 (López y cols, 1984b), que

**Tabla XIII:** Transferencia plasmídica en estirpes de *S. pneumoniae* con los plásmidos pLS1, pLS5 y pLS86

Estirpe receptora	DNA donador <sup>a</sup>	Transformantes/ml		Eficiencia de Transferencia plasmídica	
		Tc <sup>r</sup>	Sm <sup>r</sup>	PI/Cr <sup>b</sup>	$\frac{PI/Cr^c}{PI/Cr \text{ de } 641} (\%)$
641	pLS1	24.000		1,40	100
MP541		< 1		< 0,00043	< 0,030
MP551		< 1		< 0,00030	< 0,020
MP555		5.300		1,06	75,7
MP560		2.000		0,13	9,2
641	pLS5	29.000		1,70	100
MP541		< 1		< 0,00043	< 0,025
MP551		< 1		< 0,00030	< 0,017
MP555		5.500		1,1	64
MP560		1.800		0,12	7
641	pLS86	275.000		15,9	100
MP541		7.200		3,1	19,6
MP551		9.200		2,8	18,2
MP555		74.000		14,9	93,7
MP560		150.000		10,0	62,8
641	Crom.		17.400		
MP541			2.300		
MP551			3.300		
MP555			5.000		
MP560			15.000		

<sup>a</sup> Se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de cada uno de los plásmidos, o de DNA cromosómico.

<sup>b</sup> La eficiencia total de transferencia plasmídica (PI/Cr) se expresa en función del número de transformantes obtenidos con el DNA plasmídico respecto al DNA cromosómico

<sup>c</sup> La eficiencia relativa de transferencia plasmídica (PI/Cr/PI/Cr de 641) indica el porcentaje de transferencia plasmídica en las estirpes mutantes respecto a la estirpe silvestre 641

contenían respectivamente insertos cromosómicos de tres regiones *polA*, *mal* y *sul* de *S. pneumoniae*. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Tabla XIV, y fueron similares a los detectados con pLS86 (Tabla XIII). Las eficiencias de transferencia relativa obtenida con los plásmidos pLS69, pSM22, pLS83 fueron del 50%, 27% y 20%.

Los resultados mostrados en las Tablas XIII y XIV, confirman que los plásmidos recombinantes son capaces de establecerse por mecanismos en los que Spn PolII es sustituida parcialmente por otras proteínas.

### **Función del dominio polimerasa de Spn PolII en la replicación de plásmidos con el replicón de pLS1**

Estudiamos la influencia de las mutaciones *polA* en la replicación de plásmidos determinando la estabilidad segregacional de los plásmidos establecidos en estirpes que presentan mutaciones *polA* y analizando las formas intermediarias de la replicación plasmídica en estirpes deficientes en actividad polimerasa.

#### Estabilidad de los plásmidos con el replicón pLS1 en estirpes *polA* mutantes

La estirpe *S. pneumoniae* 641 conteniendo un plásmido vector (pLS5) o un recombinante (pLS83), se transformó con los plásmidos pSM28, pSM41 y pSM29 (Fig. 14) linearizados con los enzimas *EcoRI* y *PstI*, para impedir el establecimiento plasmídico e introducir los insertos *polA* de los plásmidos en el cromosoma (Tabla XV). Se seleccionaron los transformantes resistentes a Cm y Cm + Tc, y se contabilizaron el número de bacterias que habían introducido la mutación *polA*, resistentes a Cm, y las que además mantenían el plásmido, que confiere resistencia a Tc. La transformación con el inserto del plásmido pSM29 en ambas estirpes se utilizó como control, ya que dicho plásmido contiene un gen *polA* silvestre. En la Tabla XV, se muestran los datos obtenidos en estas transformaciones. La introducción en el cromosoma de las mutaciones *polA* $\Omega$ (1052bp::*cat*) del plásmido pSM41 y *polA* $\Omega$ (1861bp::*cat*) del plásmido pSM28 conllevaron a la pérdida del plásmido pLS5 en más del 90% de los transformantes Cm<sup>r</sup>. Este efecto no fue tan drástico cuando la estirpe contenía el plásmido recombinante pLS83, ya que un 25% de los transformantes que contienen el inserto del pSM41 son resistentes a Cm y Tc, y además la introducción del inserto del pSM28 sólo reduce a un 60% el número de transformantes resistentes a ambos antibióticos. La inserción del gen *cat* en la región *polA* (transformación con pSM29) afectó ligeramente a la replicación de los plásmidos pLS5 y pLS83, indicando la pérdida del plásmido en un 29% y un 15% de los transformantes Cm<sup>r</sup>, respectivamente. Se observó otra diferencia en las estirpes 641[pLS5] y 641[pLS83] transformadas con los insertos del pSM41 y pSM28, respecto a estas mismas estirpes transformadas con el inserto de pSM29. Las placas de selección Cm y Tc tuvieron que ser

**Tabla XIV:** Transferencia de plásmidos recombinantes en estirpes de *S. pneumoniae*

Estirpe receptora	DNA donador <sup>a</sup>	Transformantes/ml		Eficiencia de Transferencia plasmídica	
		Tc <sup>r</sup>	Sm <sup>r</sup>	PI/Cr <sup>b</sup>	$\frac{PI/Cr^c}{PI/Cr \text{ de } 641}$
641	pSM22	36.000		14,4	100
MP541		16.000		3,9	27
641	pLS69	26.000		10,4	100
MP541		22.000		5,3	50
641	pLS83	46.000		18,4	100
MP541		13.000		3,1	16
641	Crom.		2.500		
MP541			4.100		

<sup>a</sup> Se transformó con las mismas cantidades de DNA que en Tabla XIII

<sup>b, c</sup> La eficiencia total y relativa de transferencia plasmídica se calcula de forma similar a lo indicado en la Tabla XIII

incubadas 10 días para poder cuantificar los transformantes resistentes a ambos antibióticos, mientras que en la transformación con pSM29 sólo fueron necesarios 2 días. Al final de la incubación el tamaño de las colonias de las estirpes mutantes fue mucho menor que el de la estirpe silvestre. Esta ralentización del tiempo de duplicación celular en placa, fue comprobada en cultivo líquido, el tiempo de duplicación de las estirpes mutantes con plásmido en presencia de Tc, fue aproximadamente de 75 min, mientras que cuando se eliminó la presión selectiva en el medio de cultivo se alcanzó un tiempo mínimo de duplicación de 40 min a las 40 generaciones. Este experimento demuestra la inestabilidad del vector pLS5 en los mutantes *polA*, ya que solo un 4% y 11% de los transformantes *polA* (con los insertos cromosómicos de pSM41 y pSM28) mantienen el plásmido después de aproximadamente 30 generaciones con presión selectiva, que es el número de generaciones estimadas que transcurren hasta la formación de una colonia. La replicación del plásmido recombinante es afectada en menor medida por la inserción de mutaciones en el gen *polA*, siendo más inestable el plásmido pLS83 en la estirpe *polA* $\Omega$ -(1052bp::cat) que en la estirpe *polA* $\Omega$ (1861bp::cat).

A continuación estudiamos la estabilidad generacional del plásmido pLS86 en las estirpes de *S. pneumoniae* MP541[pLS86], MP551[pLS86], MP560[pLS86], crecidas sin presión selectiva. En las dos primeras estirpes el gen *polA* mutante codifica una proteína Spn PolII con actividad exonucleásica 5'→3', y en la estirpe MP560, existen dos derivados Spn PolII, PolIn351b y PolIc269 que poseen el dominio exonucleásico y polimerásico de Spn PolII, respectivamente. En este experimento se crecieron las bacterias primeramente en un medio de cultivo con la doble selección antibiótica, Cm y Tc, para intentar obtener el máximo número de células iniciales con plásmido. Posteriormente, se eliminó del medio de cultivo la presión selectiva, y se extrajeron muestras cada 10 generaciones. En estas se analizó el número de viables totales (crecidos en sacarosa), los resistentes a Tc, que indican las células que mantienen suficiente número de copias de plásmido para conferir resistencia al antibiótico, y las células que crecen en Cm, que poseen la mutación *polA* en su cromosoma. Los viables en los medios con sacarosa y con Cm fueron idénticos, demostrando que la mutación *polA* es estable en el cromosoma (resultados no mostrados). En la Fig. 39 se representa el porcentaje de células resistentes a Tc respecto al número total de células viables, frente al número de generaciones transcurridas de crecimiento del cultivo sin presión selectiva. El plásmido pLS86 es estable en la estirpe MP560 a lo largo de 50 generaciones, mientras que en MP541[pLS86] y MP551[pLS86], el número de bacterias con plásmido iba disminuyendo en el cultivo crecido sin Tc en función de las generaciones transcurridas. Incluso con presión selectiva no todas las bacterias poseen el plásmido, en la estirpe MP541[pLS86] únicamente el 80% de las bacterias mantienen el plásmido, siendo este porcentaje del 60% en la estirpe MP551[pLS86] (tiempo 0 en la Fig. 39). El número de copias del plásmido pLS86 (aproximadamente 22 en la estirpe silvestre) descendió a 16 y 12 en las estirpes MP541 y MP551 crecidas en un medio de cultivo con Tc, en estimaciones realizadas por densitometría, según se indica en el apartado de

Tabla XV: Inestabilidad plasmídica en las estirpes *polA* mutantes

Estirpes	DNA donador <sup>a</sup>	Transformantes/ml			Eficienc. de Transformación PI/Cr <sup>b</sup>	
		Cm <sup>r</sup>	Cm <sup>r</sup> + Tc <sup>r</sup>	Sm <sup>r</sup>	Cm <sup>r</sup>	Cm <sup>r</sup> + Tc <sup>r</sup>
641[pLS5]	pSM28	24.000	2.900		1,26	0,15
	pSM29	15.000	10.800		0,78	0,56
	pSM41	43.000	1.900		2,26	0,10
641[pLS83]	pSM28	19.000	12.000		1,11	0,70
	pSM29	11.000	9.800		0,64	0,57
	pSM41	41.000	11.000		2,41	0,64
641[pLS5]	Crom.			19.000		
641[pLS83]	Crom.			17.000		

<sup>a</sup> 2,5  $\mu$ g de DNA plasmídico digerido con *EcoRI* y *PstI* ó 1  $\mu$ g de DNA cromosómico fueron utilizados para transformar 1 ml de cultivo competente de las estirpes portadoras de plásmidos, como se describe en el apartado de Métodos

<sup>b</sup> La eficiencia de transformación del DNA plasmídico digerido, conteniendo alelos *polA*, se calculó refiriendo el número de transformantes obtenidos con el DNA plasmídico resistentes a Cm ó Cm + Tc, al número de transformantes obtenidos con DNA cromosómico resistentes a Sm

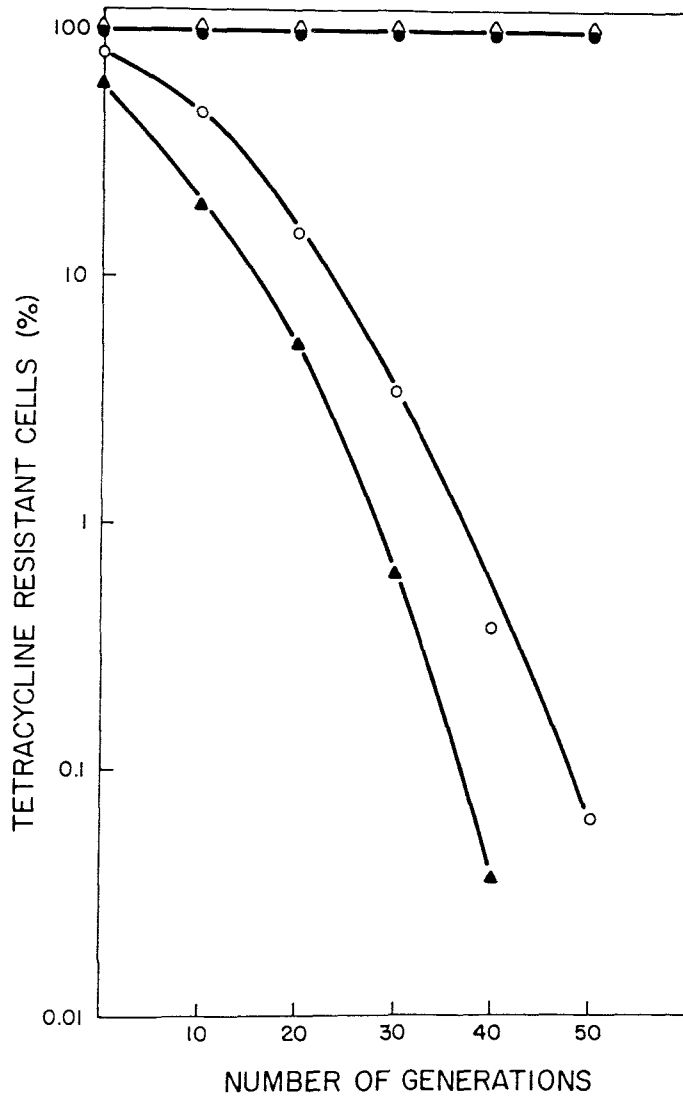


Fig. 39. Estabilidad del plásmido pLS86 en las estirpes de *S. pneumoniae* 641, MP541, MP551 y MP560. La proporción de células conteniendo plásmido, en cultivos en crecimiento exponencial se determinó como el porcentaje de células Tc<sup>r</sup> respecto al número de células viables. Símbolos: MP541, círculo blanco; 641, círculo negro; MP560, triángulo blanco; MP551, triángulo negro.

Métodos. Los resultados presentados en la Fig. 39 confirman los datos previos mostrados en la Tabla XV, que indicaban que la mutación *polA* interfiere con la replicación plásmidica. Las curvas de viables Tc<sup>r</sup> de estas dos últimas estirpes son prácticamente idénticas, pero desfasándose 10 generaciones los valores obtenidos en la estirpe MP551 respecto a MP541. Esta diferencia es posiblemente consecuencia del distinto porcentaje de células iniciales con plásmido en las dos estirpes analizadas.

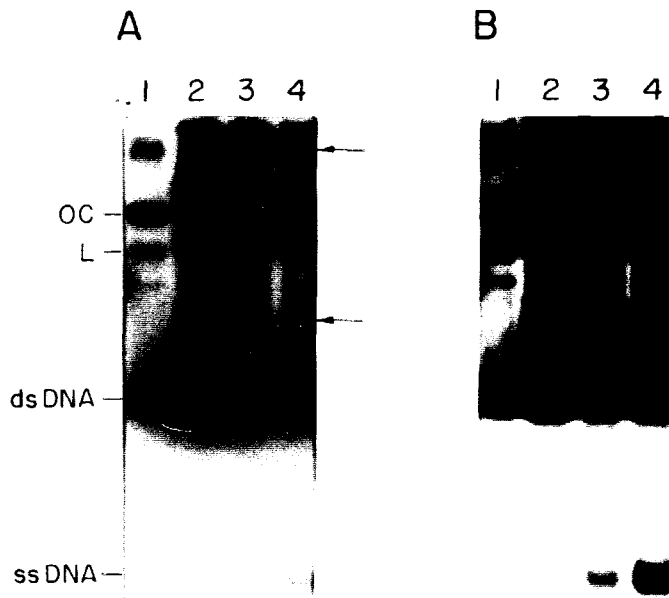
#### Análisis de las formas plásmidicas acumuladas en las estirpes mutantes *polA*

Los plásmidos basados en el plásmido pLS1 replican según el modelo de círculo rodante asimétrico. La replicación es iniciada por la proteína RepB codificada por el plásmido, ésta provoca una rotura monocatenaria en una secuencia de la hebra (+) del DNA, situada en una compleja estructura secundaria (ori +). Esta rotura da lugar a un extremo 3'-OH que sirve de "primer" para el inicio de la replicación, utilizando la maquinaria replicativa de la célula hospedadora, que en su avance va desplazando la hebra (+). Terminada ya la copia de la hebra(-), RepB cierra el círculo monocatenario y como balance replicativo se obtienen dos moléculas, una bicatenaria superenrollada (ccc) y otra monocatenaria circular. Esta última forma plasmídica posee una estructura (ori -) reconocida por enzimas del huésped, que es utilizada como molde para sintetizar un RNA "primer", a continuación otros enzimas iniciarán la conversión de la monocadena a bicadena. La última etapa en la replicación es la eliminación del RNA "primer" y la creación de una forma ccc, con lo que se ha conseguido la duplicación de la forma ccc inicial (véase Fig. 50) (del Solar, 1991).

Analizamos las formas plasmídicas presentes en extractos de DNA totales de las distintas estirpes. Se separaron electroforéticamente dichas formas en geles de agarosa neutros, el DNA se desnaturalizó, se transfirió a filtros de nitrocelulosa y se hibridó con una sonda radiactiva de pLS1. Se observaron como control, las formas acumuladas en extractos de DNA de la estirpe 641[pLS86] crecida en Tc (Fig. 40A y B, calle 2) y se examinaron los intermediarios de replicación en las estirpes MP541[pLS86], MP551[pLS86] crecidas en presencia de Tc (Fig. 40A y B, calles 3 y 4). En este gel podemos observar en las estirpes MP541 y MP551 un incremento de la forma monocatenaria del plásmido (ssDNA) de 3 y 10 veces, respecto a la acumulación de ssDNA de la estirpe 641[pLS86]. Además advertimos en las estirpes mutantes *polA* otras moléculas plasmídicas acumuladas que no hemos sabido adscribir a ninguna forma replicativa (Fig. 40A).

Además de la forma monocatenaria del plásmido pLS86 detectada en las estirpes *polA* deficientes, era probable que existieran otros intermediarios, ya que en la replicación mediante círculo rodante asimétrico del fago M13 se requiere la DNA polimerasa I de *E. coli*. Las actividades exonucleásica 5'→3' y polimerásica de Eco PolI convierten la forma de DNA RFII en RFI (Chen y Ray, 1976; Dasgupta y Mitra, 1978). En ausencia de alguna de estas actividades se detectan moléculas de DNA bicatenarias incompletas, con discontinuidades





**Fig. 40.** Análisis de las formas plasmídicas de pLS86 presentes en las estirpes de *S. pneumoniae* 641, MP541 y MP551. (A) Se analizaron en un gel de agarosa al 0,8% las formas plasmídicas de pLS86 presentes en la estirpe silvestre 641 y las estirpes mutantes *polA*, MP541 y MP551. Extractos de DNA total de las estirpes 641, MP541 y MP551 (calles 2, 3 y 4). Calle 1, 15 ng de plásmido pLS86. Se transfirió el DNA en condiciones desnaturalizantes a un filtro de nitrocelulosa y se hibridó con una sonda radiactiva de pLS1. Se indican a la derecha las posiciones de las formas del plásmido pLS86, circulares abiertas (OC), lineales (L), circulares covalentemente cerradas (ds DNA) y monocatenarias (ssDNA). A la izquierda de la Fig. se indican con flechas las posiciones de formas acumuladas del plásmido pLS86 en las estirpes mutantes *polA*, no presentes en la estirpe silvestre. (B) Igual que A, excepto que es una autorradiografía sobrexpuesta.

próximas al origen de replicación de la hebra (+). Intentamos detectar moléculas intermediarias de la replicación del plásmido pLS86, que se acumularían debido a la ausencia de la actividad polimerásica de Spn PolI en las estirpes deficientes MP541 y MP551. Los extractos de DNA se digirieron con *EcoRI* y mediante electroforesis en geles de agarosa alcalinos se fraccionaron los fragmentos de DNA. El DNA del gel fue transferido en condiciones no desnaturalizantes a un filtro de nitrocelulosa, que fue hibridado con la sonda pLS1. En la Fig. 41 presentamos la autorradiografía del gel alcalino, en todas las muestras (calles 1-8) se observa un fragmento de DNA de 4,4 kb que hibrida con la sonda, correspondiente al vector pLS1 del plásmido pLS86. Además en las estirpes MP541[pLS86] y MP551[pLS86] (calles 3-5 y 6-8) se detectan 4 bandas de menor intensidad que el fragmento de 4,4 kb, y que migrarían a la posición de 3,2 kb, 2,7 kb, 1,7 kb y 1,2 kb. Estos fragmentos detectados como productos de la digestión con *EcoRI* del DNA de los mutantes *polA* indican la presencia de discontinuidades próximas a las secuencias ori (+) y ori (-) del plásmido pLS86.

## EFFECTO DE LA IRRADIACION CON LUZ UV EN *S. PNEUMONIAE* Y *E. COLI*: REPARACION DE DNA POR SPN POLI

### Reparación de daños en el DNA inducidos por luz UV en *S. pneumoniae*

La capacidad de reparación de DNA por Spn PolI y sus derivados fue analizada por irradiación con luz UV de las estirpes: R61, MP555, MP558 y MP560. Estas bacterias fueron irradiadas con una lámpara de luz UV, a una energía de 2,4 J/m<sup>2</sup> por segundo y se determinó la viabilidad celular (Fig. 42). La estirpe MP558 que expresa el derivado Spn PolIn351b carente de actividad polimerásica mostró una mayor sensibilidad a luz UV que la estirpe parental MP555, codificante de los polipéptidos Spn PolI y Spn PolIn351b. Esta última, fue más sensible que la estirpe silvestre R61, debido a la presencia de otras mutaciones acumuladas en la estirpe 641 de la que procede. La sensibilidad a luz UV de la estirpe MP560 fue intermedia entre la estirpe silvestre MP555 y la mutante MP558. Dicha estirpe MP560 expresa el derivado Spn PolIc269 con una actividad polimerásica reducida al 20% (véase Tabla XII), que permite la reparación de daños en el DNA a bajas dosis de energía, similar al nivel mostrado por MP555, pero la sensibilidad de la estirpe MP560 a una irradiación superior a 15 J/m<sup>2</sup> fue superior que la mostrada por la estirpe parental MP555. De los datos presentados en la Fig. 42, podemos inferir que la supresión del dominio polimerasa de Spn PolI conlleva en las bacterias un aumento de la mortandad celular provocado por la irradiación con luz UV. Esta disminución de la viabilidad es corregida parcialmente por la complementación con el derivado Spn PolIc269.

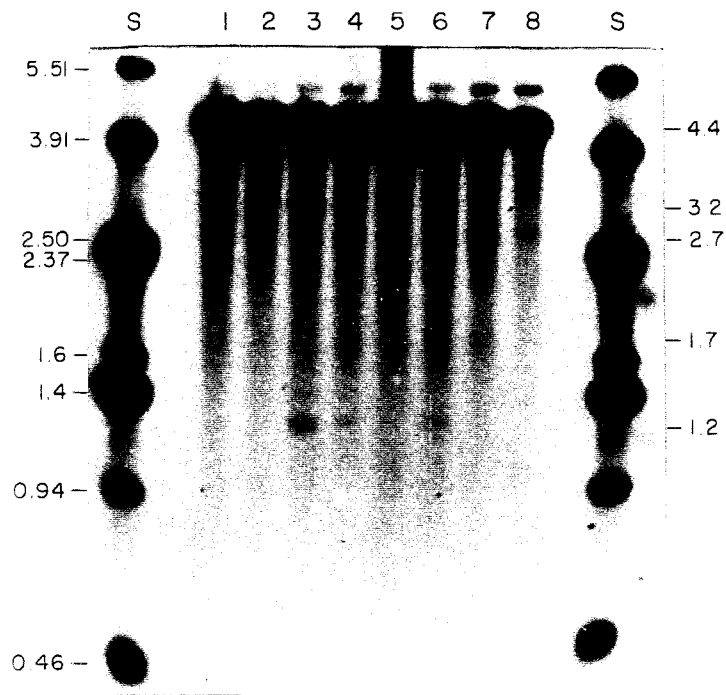
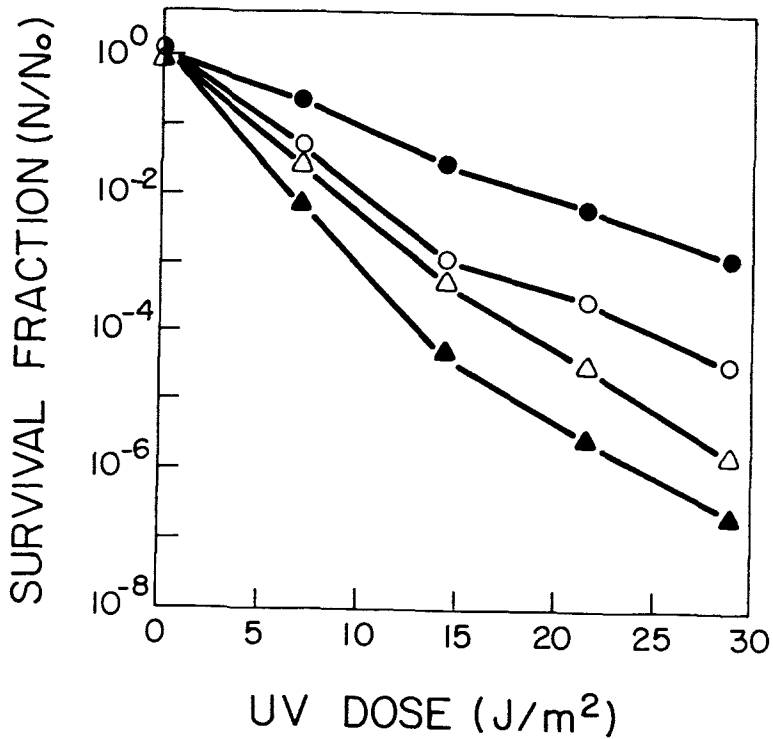


Fig. 41. Análisis de los intermediarios de replicación de pLS86 presentes en las estirpes *S. pneumoniae* 641 (calles 1 y 2), MP541 (calles 3-5) y MP551 (calles 6-8). Se analizaron las formas intermediarias de replicación del plásmido pLS86 en las estirpes silvestres y mutantes *polA* en un gel alcalino al 0,8%. Extractos de DNA preparados de cultivos de *S. pneumoniae* crecidos en presencia de Tc (calles 1, 3 y 6), crecidos sin Tc, durante 10 generaciones (calles 4 y 7), ó 20 generaciones (calles 2, 5 y 8), fueron digeridos con *EcoRI*. Calle S, mezcla de fragmentos utilizados como estándar de los plásmidos pSM28 digerido con *EcoRV*, pLS1 digerido con *AvaII* y *BglII*, y pLS86 digerido con *NcoI* y *HindIII*. El tamaño de los fragmentos en kb aparece indicado a la izquierda de la Fig. A la derecha se indica el tamaño (en kb) de los fragmentos obtenidos por la digestión con *EcoRI* del DNA de las estirpes *polA* mutantes.

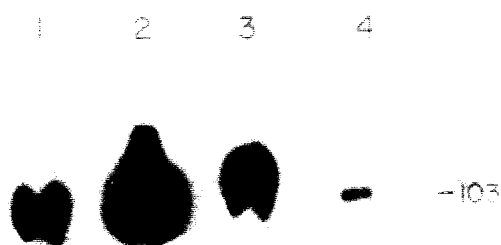


**Fig. 42.** Sensibilidad a luz UV de las estirpes de *S. pneumoniae* R61, MP555, MP558 y MP560. Las irradiaciones y la determinación de las células viables se realizaron como se describe en Métodos. Símbolos: círculo blanco, MP555 (Exo<sup>+</sup> ectópico, Exo<sup>+</sup> Pol<sup>+</sup>); círculo negro, R61 (Exo<sup>+</sup> Pol<sup>+</sup>); triángulo blanco, MP560 (Exo<sup>+</sup> ectópico, Exo<sup>-</sup> Pol<sup>+</sup>); triángulo negro, MP558 (Exo<sup>+</sup> ectópico, Exo<sup>-</sup> Pol<sup>-</sup>). Entre paréntesis se indican los fenotipos de Spn PolI conferidos por las estirpes.

### Reparación por Spn PolI de daños en el DNA inducidos por luz UV y MMS en mutantes *polA* de *E. coli*

Se realizaron estudios de complementación heteróloga de Spn PolI en *E. coli*. Para este propósito el inserto cromosómico de pSM22, conteniendo el gen *polA* de *S. pneumoniae*, incluido en un fragmento *EcoRI*, fue subclonado en el sitio único *EcoRI* del plásmido vector pLG339. Este vector contiene el replicón pSC101, que no requiere Eco PolI para su replicación. El plásmido recombinante obtenido se denominó pSM31. Dicho plásmido fue transferido a la estirpe *E. coli* ME1034 *polA5*. La mutación *polA5* de *E. coli* codifica un derivado Eco PolI con una actividad polimerásica disminuida, debido a la reducción a un 20% de la procesividad de polimerización (Matson y cols, 1978). Analizamos la expresión del gen *polA* del plásmido pSM31 mediante la técnica de polimerización *in situ*. Las proteínas de los extractos celulares *E. coli* ME1034 *polA5*[pLG339], C600, ME1034 *polA5*[pSM31] y *S. pneumoniae* 641[pSM22] (Fig. 43, calles 1-4) se separaron en SDS-PAGE con DNA activado en la matriz, y el gel se reveló para actividad polimerásica como se describe en Métodos. La estirpe *E. coli* ME1034 *polA5* [pLG339] codifica para un derivado Eco PolI de la misma talla que la proteína silvestre de la estirpe C600, pero con una actividad polimerásica residual (Fig. 43, calle 1 y 2). La introducción en la estirpe mutante del plásmido pSM31 incrementó la incorporación de dNTP en el DNA de la matriz del gel (Fig. 43, calle 3) en una posición correspondiente a Spn PolI. A continuación valoramos la actividad polimerásica de las estirpes de *E. coli* silvestre y mutantes en comparación con las estirpes de *S. pneumoniae* 641 con o sin el plásmido pSM22 (Tabla XVI). La presencia del plásmido pSM31 en la estirpe *polA5* elevó la actividad polimerásica hasta alcanzarse niveles similares a los detectados en la estirpe *E. coli* C600. Se esperaba un nivel de actividad más alto, correspondiente con la presencia de 7 copias del plásmido pSM31 por célula en el mutante *polA5*, en base a los resultados obtenidos en extractos de *S. pneumoniae* (Tabla XVI). Después de confirmar la expresión de Spn PolI en el mutante *polA5*, sometimos a las estirpes de *E. coli* a irradiación con luz UV, a una dosis de 2,7 J/m<sup>2</sup> por segundo. Las bacterias irradiadas fueron plaqueadas en medio rico, para potenciar la reparación vía escisión. La presencia de la mutación *polA5* en *E. coli* aumenta drásticamente la sensibilidad de la estirpe a irradiación con luz UV, como había sido mostrado por Matson y Bambara, (1981). La supervivencia celular en el mutante *polA5* descendió 5 ordenes de magnitud respecto a la estirpe silvestre C600, a la máxima dosis de energía ensayada (Fig. 44A), que fue dos veces superior a la empleada en *S. pneumoniae* (Fig. 42). La presencia del plásmido pSM31 aumento la supervivencia celular de los cultivos, mostrando la sustitución de Eco PolI por Spn PolI en el sistema de reparación por escisión de *E. coli*.

A continuación analizamos la complementación de la mutación *polA5* de *E. coli* con el gen *polA* de *S. pneumoniae* en la reparación de daños en el DNA causados por el agente alquilante (MMS). Cultivos de las distintas estirpes de *E. coli* fueron tratados con 25 mM MMS y se

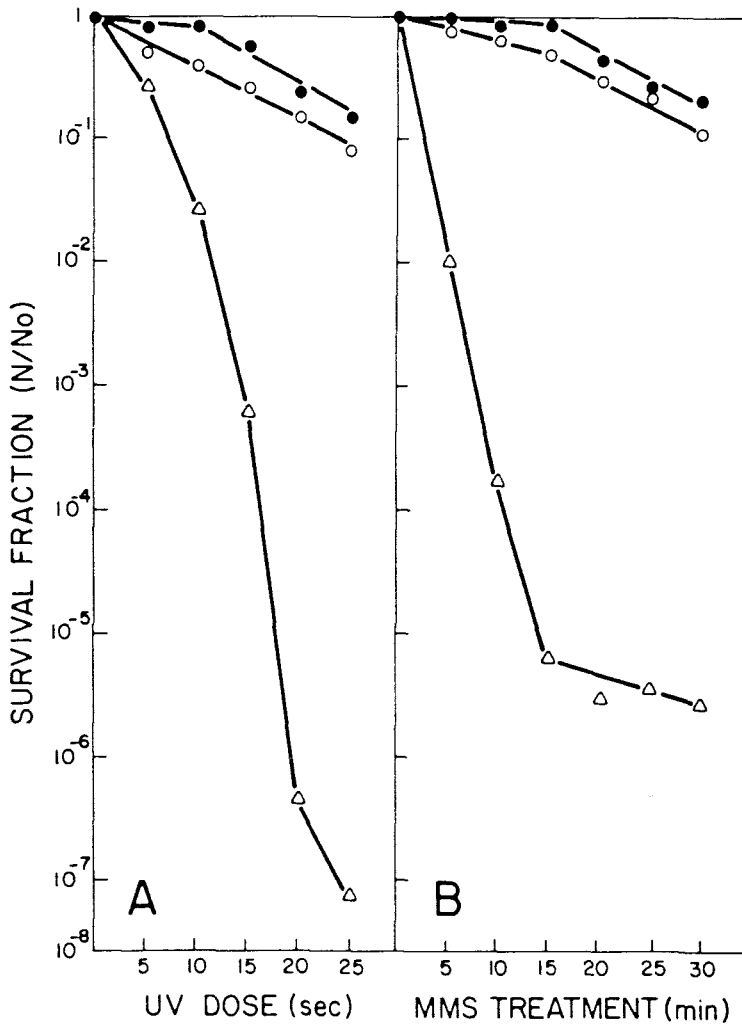


**Fig 43. Detección de actividad polimerásica *in situ*.** Se analizó la actividad polimerásica de extractos preparados a partir de las estirpes *E. coli* ME1034 *polA5* [pLG339], *E. coli* C600, *E. coli* ME1034 *polA5* [pSM31] y *S. pneumoniae* 641 [pSM22] (calles 1, 2, 3 y 4, respectivamente), como se detalla en el apartado de Métodos. Se fraccionaron 100  $\mu$ g de proteínas (calles 1-3) y 5  $\mu$ g de proteínas (calle 4).

**Tabla XVI: Actividad polimerásica valorada en extractos crudos de *S. pneumoniae* y *E. coli***

Estirpe receptora	Plásmido	Actividad específica polimerasa* (U/mg prot.)
<i>S. pneumoniae</i> 641 <i>polA</i> <sup>+</sup>	-	23,0
	pSM22	437,8
<i>E. coli</i> C600 <i>polA</i> <sup>+</sup>	-	37,2
<i>E. coli</i> ME1034 <i>polA5</i>	pLG339	1,8
	pSM31	31,1

\* La actividad polimerásica se determinó como se detalla en el apartado de Técnicas Específicas de Métodos.



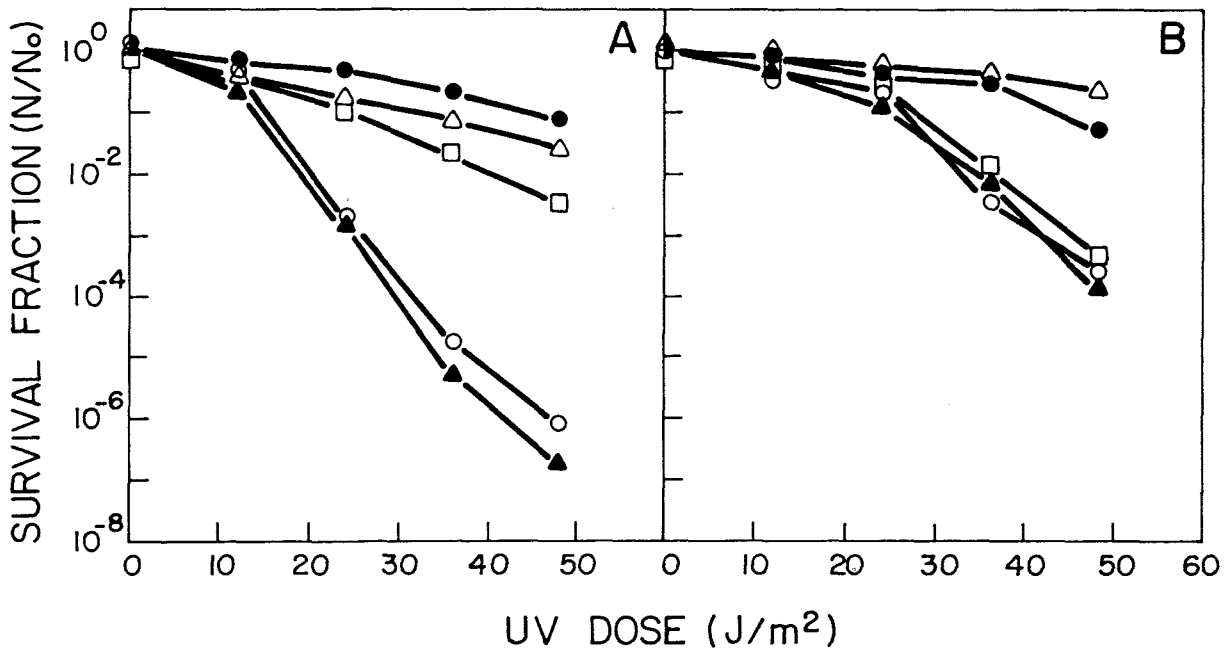
**Fig. 44. Complementación de Spn PolII en mutantes deficientes en la actividad polimerásica de *E. coli*. (A) y (B) Supervivencia celular de estirpes de *E. coli* tratadas con luz UV y MMS, analizada como se detalla en Métodos. Símbolos: ME1034 *polA5* [pSM31(Exo<sup>+</sup> Pol<sup>+</sup>)], círculo blanco; C600 *polA*<sup>+</sup>, círculo negro; ME1034 *polA5* [pLG339(Exo<sup>-</sup> Pol<sup>-</sup>)], triángulo blanco. Entre paréntesis se indican los fenotipos de Spn PolII conferidos por los plásmidos.**

extrajeron alicuotas de los cultivos a distintos tiempos. En estas muestras se analizó el número de viables y se representó el porcentaje de células supervivientes frente al tiempo de exposición al agente MMS (Fig. 44B). Nuevamente, Spn PolI mostró su capacidad para sustituir a la proteína homóloga de *E. coli* en la reparación de daños por agentes alquilantes.

Después de comprobar que existía una complementación de Spn PolI en la reparación de daños en el DNA del mutante *polA5* de *E. coli*, quisimos comprobar si los dominios de actividad exonucleásica y polimerásica de Spn PolI eran capaces de complementar de forma independiente mutaciones de Eco PolI. Para ello, construimos varios plásmidos derivados de pLG339, que contenían los insertos cromosómicos de los plásmidos pSM41 y pSM51 (véase Fig. 34). Estos plásmidos fueron linearizados con *EcoRI* y ligados al vector pLG339 linearizado con *EcoRI* y tratado con fosfatasa alcalina, para impedir la reconstitución de vectores en la ligación. Con estas ligaciones se transformó la estirpe *E. coli* ME1034 *polA5*, se seleccionaron transformantes resistentes a Km + Cm. Se analizó el contenido plasmídico de los clones y se aislaron transformantes que presentaban los plásmidos pSM44 y pSM45, que contienen el dominio exonucleasa (PolIn351a) y polimerasa (PolIc269) de Spn PolI. A continuación, estudiamos el efecto de la presencia de los derivados de Spn PolI en la supervivencia de la estirpe *E. coli polA5* sometida a irradiación con luz UV (Fig. 45A). Se representó el porcentaje de viables frente a la dosis de energía y se observó que la estirpe *polA5*[pSM45] muestra un nivel intermedio de resistencia a irradiación, debido a la expresión del derivado Spn PolIc269 en la estirpe *polA5*. La estirpe *polA5*[pSM44] se comporta igual que la estirpe sin plásmido, no ejerciendo el derivado Spn PolIn351a ningún efecto positivo.

Por último, realizamos un experimento de complementación en otra estirpe de *E. coli* RS5064, que presenta la mutación *polA480ex*, cuyo producto génico es una proteína Eco PolI con una reducción severa en su actividad exonucleásica 5'→3' (Cooper, (1977); Wahl y cols, (1983). Analizamos el efecto de la irradiación con luz UV en esta estirpe conteniendo los plásmidos pLG339, pSM31, pSM44 ó pSM45. La expresión de Spn PolI en la estirpe mutante complementó la mutación *polA480ex* (Fig. 45B). Sin embargo, la presencia de los plásmidos pSM44 ó pSM45 en la estirpe mutante no conllevó un incremento de la viabilidad celular después de la irradiación.





**Fig. 45. Complementación de Spn PolIc269 y Spn PolIn351a en mutantes deficientes en la actividad polimerásica (A) y exonucleásica (B) de *E. coli*.** (A) Sensibilidad a luz UV de las estirpes de *E. coli* ME1034 *polA5* [pSM44(Exo<sup>+</sup> Pol<sup>-</sup>)], círculo blanco; C600 *polA*<sup>+</sup>, círculo negro; ME1034 *polA5* [pSM31(Exo<sup>+</sup> Pol<sup>+</sup>)], triángulo blanco; ME1034 *polA5* [pLG339(Exo<sup>-</sup> Pol<sup>-</sup>)], triángulo negro; ME1034 *polA5* [pSM45(Exo<sup>-</sup> Pol<sup>+</sup>)], cuadrado blanco. (B) Sensibilidad a luz UV de las estirpes *E. coli* RS5064 *polA480ex* [pLG339(Exo<sup>-</sup> Pol<sup>-</sup>)], círculo blanco; C600 [pSM31(Exo<sup>+</sup> Pol<sup>+</sup>)], círculo negro; RS5064 *polA480ex* [pSM31(Exo<sup>+</sup> Pol<sup>+</sup>)], triángulo blanco; RS5064 [pSM44(Exo<sup>+</sup> Pol<sup>-</sup>)], triángulo negro; RS5064 [pSM45(Exo<sup>-</sup> Pol<sup>+</sup>)], cuadrado blanco. Entre paréntesis se indican los fenotipos de Spn PolI conferidos por los plásmidos.

## **DISCUSSION**

## EXPRESION DEL GEN POLA DE *S. PNEUMONIAE*

El trabajo experimental desarrollado en esta Memoria ha permitido la determinación de la secuencia de nucleótidos del gen *polA*, así como los sitios de iniciación y terminación de la transcripción en *S. pneumoniae*, *B. subtilis* y *E. coli*.

El gen *polA* de *S. pneumoniae* muestra una posible región promotora para la transcripción que presenta una secuencia similar a la reconocida por los factores sigma mayoritarios de las RNA polimerasas de *E. coli* y *B. subtilis*. Dicho promotor posee una región -10 idéntica a la consenso, sin embargo, la región -35, difiere en tres nucleótidos de la secuencia consenso (Rosenberg y Court, 1979). La predicción de estructura secundaria del extremo 3' del RNA transcrito del gen *polA* indica que es capaz de adoptar una estructura tipo tallo-lazo (rica en apareamientos guanidina y citosina), seguida en su extremo 3' de varios residuos uridina. Estos elementos son característicos de los terminadores de transcripción rho-independientes (revisado en Rosenberg y Court, 1979; revisado en Platt, 1986). El terminador de transcripción del gen *polA* es reconocido por los tres sistemas bacterianos analizados, sin embargo, en *E. coli* este terminador no es tan eficiente como en *B. subtilis* ó *S. pneumoniae*. Este hecho es probablemente debido a que la estructura tallo-lazo del transcrito mRNA del gen *polA* muestra una eficiencia teórica de terminación del 70% en el sistema de *E. coli* (d'Aubenton-Carafa y cols, 1990), observándose mayor número de bandas distribuidas en la región próxima al extremo 3' de la estructura tallo-lazo.

La expresión del gen *polA* en los tres sistemas bacterianos analizados (*S. pneumoniae* y *E. coli*, en este trabajo, y *B. subtilis* en Martínez y cols, 1987) es cuantitativamente diferente. La estirpe *S. pneumoniae* [pSM22] incrementa la actividad polimerásica de 12 a 18 veces, respecto a la estirpe sin el plásmido, observándose una eficiencia de 0,5 a 0,75 en la expresión del gen, respecto al número de copias del plásmido pSM22 (aproximadamente 24 copias). Por el contrario en *B. subtilis* *polA*<sup>+</sup> [pSM22] y *E. coli* *polA5* [pSM31], la expresión del gen *polA* de neumococo es de 1,8 y 1,2 veces superior al nivel de actividad polimerásica de la estirpe *S. pneumoniae* sin plásmido. La eficiencia en la expresión del gen *polA* en aquellas estirpes sería 0,45 y 0,17, teniendo en cuenta que el número de copias del plásmido pSM22 en *B. subtilis* es aproximadamente 4 y que *E. coli* contiene 7 copias del plásmido pSM31. Las diferencias de expresión del gen *polA* en *S. pneumoniae* y *B. subtilis* no son demasiado significativas, este resultado sugiere un reconocimiento similar de las señales de transcripción y traducción en los dos sistemas bacterianos. Sin embargo en *E. coli* se observa una pobre expresión del gen *polA* neumocócico, aunque es probable que existan interferencias en la detección de la actividad polimerásica de Spn PolII por la presencia en el extracto del derivado Eco PolII de reducida procesividad.

La expresión del gen *polA* de *S. pneumoniae* es relativamente baja. Se ha estimado el número de moléculas de Spn PolII presentes en un cultivo aplicando las siguientes relaciones:

Un cultivo crecido a una absorbancia de 0,4 se corresponde con 0,1 mg de proteína por ml. En 1 ml de cultivo el número de células viables determinado como bacterias formadoras de colonias es de  $2 \times 10^8$ . A su vez cada colonia está constituida inicialmente por 4 células, ya que *S. pneumoniae* tiende a formar cadenas. Además cada célula contiene  $1,2 \times 10^{-13}$  g de proteínas (dato no publicado de S. Lacks). Estos datos, junto al rendimiento de la purificación de Spn PolI a partir de *S. pneumoniae* (López y cols, 1989) nos permiten estimar el número de moléculas de Spn PolI presentes en cada célula. La estirpe *S. pneumoniae* 641[pSM22] contiene 10.000 moléculas de Spn PolI. En esta estirpe sin plásmido la actividad polimerásica se reduce al 5%, y por lo tanto estimamos que posee aproximadamente 500 moléculas de Spn PolI por célula. Estos datos son comparables a las 400 moléculas de PolI presentes en *E. coli* (revisado en Kornberg, 1980).

Las estimaciones realizadas del número de moléculas de Spn PolI indican una débil expresión del gen *polA* de *S. pneumoniae*, ésta se podría atribuir a la falta de una secuencia promotora (región -35) consenso, que influiría en una menor transcripción del gen. Por otra parte, la determinación del inicio de la transcripción y de la traducción del gen *polA* mostró la presencia de una situación poco común entre la mayoría de los genes procarióticos conocidos. El RNA mensajero del gen *polA* comienza 2 nt antes del codon de iniciación de la traducción, este hecho implica la inexistencia de una secuencia de unión a los ribosomas delante del codon de iniciación AUG. Esta característica del gen *polA* no parece ser general en este sistema bacteriano, ya que el análisis de las secuencias de unión a los ribosomas presentes en otros genes de *S. pneumoniae* revela la existencia de secuencias de tipo Shine-Dalgarno (SD) similares a las observadas en *E. coli*, capaces probablemente de aparear de forma complementaria con el extremo 3' del 16S rRNA de la subunidad ribosomal 30S. Sin embargo en algunos genes se han observado secuencias atípicas de unión a los ribosomas (ARBS) (Mannarelli y cols, 1985; Lacks y cols., 1986; de la Campa y cols, 1987). Dicha secuencia de unión a los ribosomas de *S. pneumoniae* (5' AATTTCT... 4 ó 5 nt... TATA...9 ó 10 nt... ATG) es reconocida por los ribosomas de *E. coli*, ya que algunos de estos genes han sido hiperexpresados e hiperproducidos en esta bacteria bajo el control de sus señales de traducción naturales (de la Campa y cols, 1987). Comparativamente la secuencia SD putativa presente en el gen *polA* de *E. coli*, tampoco presenta una secuencia SD muy próxima a la consenso, mostrando únicamente tres nucleótidos (5' AGG ó 5' GGA) complementarios al 16S rRNA de la subunidad ribosomal 30S de *E. coli* (Joyce y cols, 1982).

En el reconocimiento de las señales de iniciación de la traducción se ha sugerido que influyen regiones del RNA transcrito, distintas del SD y codon de iniciación. Datos genéticos (Dreyfus, 1988), bioquímicos y estadísticos (Scherer y cols, 1980; Schneider y cols, 1986) apoyan esta hipótesis (revisado en Gold y cols, 1981; Sprengart y cols, 1990). Algunos de estos autores coinciden en las características de la secuencia del extremo 5' de los RNA transcritos. Scherer y cols, (1980) y Dreyfus, (1988) sugieren que muchos de los genes de *E. coli* presentan

detrás del codon de iniciación una región rica en residuos adenosina y timidina, que evitarían la formación de estructuras secundarias ó interaccionarían de forma complementaria con el extremo 3' del 16S rRNA de los ribosomas.

Se han descrito situaciones similares a la observada en el gen *polA* de *S. pneumoniae* en la expresión de los genes *cI* y *V* de los bacteriofagos  $\lambda$  y P2, respectivamente (Ptashne y cols, 1976; Christie y Calendar, 1985). Al igual que en el gen *polA* la eficiencia en la traducción de estos genes es baja. La transcripción del gen *cI* desde el promotor P<sub>RM</sub> da lugar a un mRNA con el codon de iniciación de la traducción situado en el extremo 5'. Este mRNA debe poseer en la zona codificante señales que posibilitan la unión de los ribosomas. La región 5' terminal de este mRNA puede adoptar una compleja estructura tallo-lazo, y además es significativa la presencia de 9 residuos adenosina consecutivos, interrumpidos por un residuo guanosina, situados delante de la posible estructura secundaria. Balakin y cols, (1992) han sugerido que principalmente estas características permiten a los ribosomas constituir el complejo de iniciación con el *cI* mRNA.

El extremo 5' de la region codificante del gen *polA* de *S. pneumoniae* contiene una región rica en residuos adenosina y timidina, destacando la existencia de 8 residuos adenosina consecutivos interrumpidos por un residuo guanosina. Probablemente estas secuencias están mediando la interacción del ribosoma con el mRNA transcrito del gen *polA* de *S. pneumoniae*.

## CARACTERISTICAS COMUNES Y DIFERENTES DE SPN POLI Y ECO POLI

La DNA polimerasa I de *E. coli* posee tres actividades enzimáticas separadas espacialmente en la estructura tridimensional (Ruscitti y cols, 1992). Así mismo, es posible separar el dominio con actividad exonucleásica 5'→3' y el fragmento Klenow (Brutlag y cols, 1969; Klenow y Henningsen, 1970) manteniendo las actividades enzimáticas de los productos polipeptídicos.

El estudio realizado en este trabajo sobre Spn PolII nos permite concluir que este enzima posee una elevada similitud estructural con Eco PolII. Esta deducción se apoya en los siguiente argumentos:

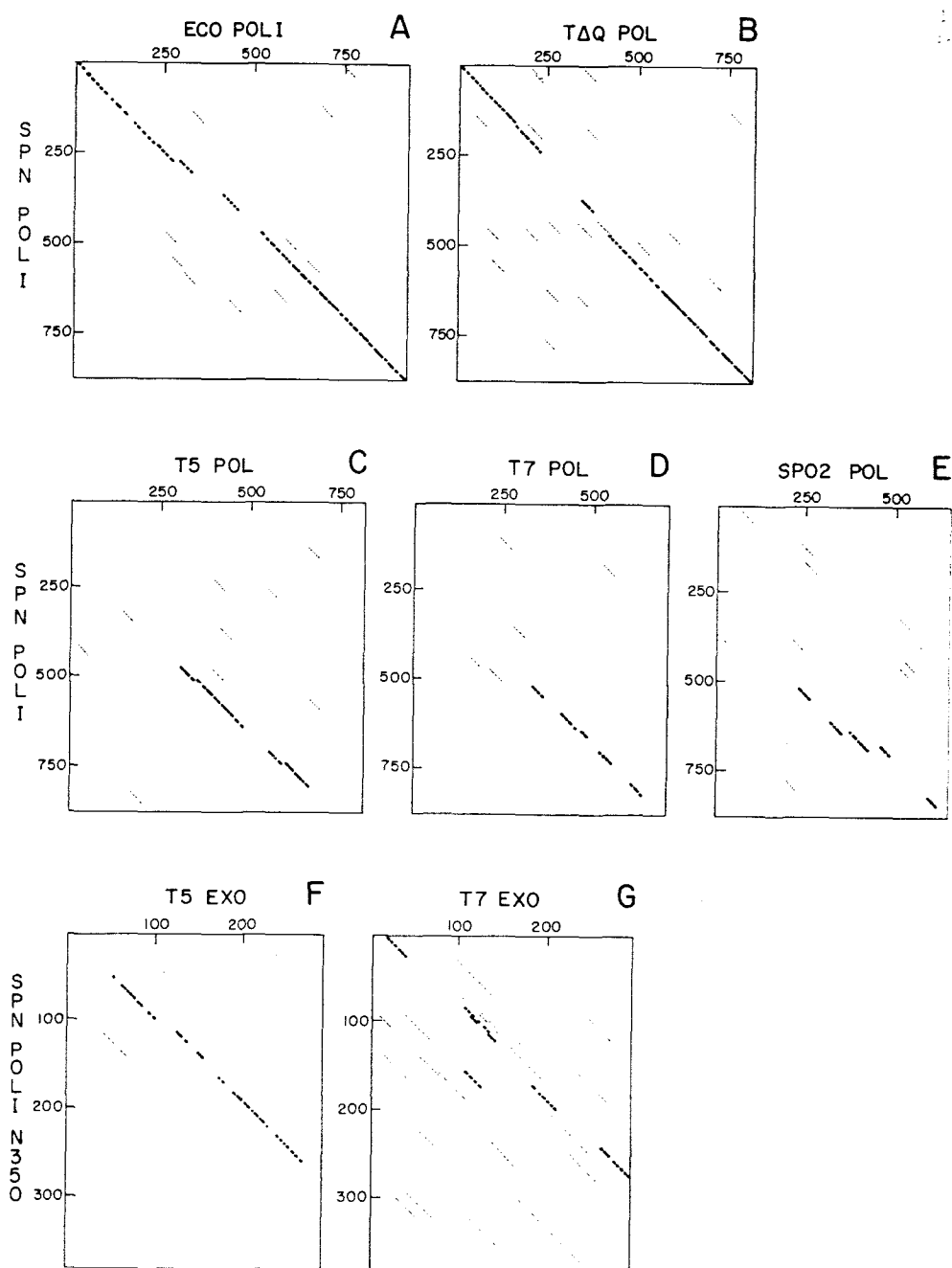
1. La conservación de aminoácidos de Eco PolII y Spn PolII permite presuponer una distribución similar de los dominios enzimáticos en el enzima neumocócico.
2. Spn PolII es susceptible a proteolisis específica por subtilisina, ésta genera dos productos de menor masa molecular a los observados en Eco PolII.
3. El dominio carboxilo de Spn PolII se superpone sobre la estructura tridimensional del fragmento Klenow, debido a la elevada homología de Spn PolII en las regiones situadas sobre la hendidura de la estructura del Klenow.
4. Los distintos subclonajes de Spn PolII nos permiten adscribir la actividad exonucleásica

5'→3' y polimerásica a los dominios amino y carboxilo de Spn PolI. Hemos delimitado ambos dominios en 351 y 609 residuos, respectivamente. Otro polipéptido de inferior masa molecular (Spn PolIn264) no conserva ninguna actividad enzimática. Esta ausencia de actividad podría ser debida a que estos polipéptidos no contienen todos los aminoácidos requeridos para ser activos catalíticamente ó a que la adición de residuos anormales, como consecuencia del clonaje, en los extremos carboxilo o amino de los polipéptidos abolen la actividad, probablemente por un plegamiento inadecuado de las proteínas. La primera hipótesis parece más factible en base a los datos obtenidos por proteólisis de Spn PolI, ya que el tratamiento con subtilisina generó dos polipéptidos de 32 kDa y 67 kDa, de masa molecular aproximada. Estos productos conservan las actividades nucleásica y polimerásica (datos no mostrados), respectivamente. Estos derivados contendrían aproximadamente 304 y 573 residuos de los extremos amino y carboxilo de Spn PolI, y son capaces de conferir las actividades enzimáticas del enzima. La estimación de los límites de los dominios enzimáticos de Spn PolI se corresponden con los datos que se conocen de Eco PolI. En este enzima el polipéptido de menor masa molecular con actividad exonucleásica 5'→3' es el generado por la mutación ambar *resA<sub>I</sub>* del gen *polA* en el residuo 298 (Kelley y Joyce, 1983). Por otro lado, el fragmento Klenow contiene 604 residuos del extremo carboxilo de la proteína (Joyce y Grindley, 1983), y aun conserva las actividades exonucleásica 3'→5' y polimerásica. Por último, un derivado con una reducida actividad polimerásica fue subclonado por Freemont y cols, (1986) y contiene 413 residuos del extremo carboxilo de Eco PolI.

La principal diferencia observada entre Spn PolI y Eco PolI es la ausencia de la actividad exonucleásica correctora 3'→5' en el enzima neumocócico. Esta característica está presente también en la DNA polimerasa de *T. aquaticus* (Tindall y Kunkel, 1988). Ambas proteínas poseen menor masa molecular que Eco PolI, y estos residuos que faltan se concentran principalmente en el dominio con actividad exonucleásica 3'→5'. Por comparación de la secuencia de aminoácidos de las polimerasas y experimentalmente (Derbyshire y cols, 1988; Freemont y cols, 1988; Bernad y cols, 1989; Blanco y cols, 1991a; Derbyshire y cols, 1991; Joyce, 1991; Blanco y cols, 1992; Reha-Krantz, 1992) se ha establecido la importancia de determinados residuos en el dominio con actividad exonucleásica 3'→5'. Los aminoácidos implicados en la unión a los metales y en la catálisis de la actividad exonucleásica 3'→5' están conservados en Spn PolI en las regiones Exo I (C<sub>265</sub>-G<sub>275</sub>), II (L<sub>324</sub>-F<sub>337</sub>) y III (L<sub>415</sub>-Y<sub>428</sub>) (Blanco y cols, 1992). Sin embargo, estos autores en el alineamiento de Spn PolI introdujeron un hueco de 84 residuos delante de la región Exo I, que conllevaría el desplazamiento de la zona sensible putativa a subtilisina, situada en el enlace peptídico (Thr<sub>304</sub>-Ile<sub>305</sub>), respecto a Eco PolI. Hemos localizado entre este par de residuos el sitio de proteólisis de Spn PolI en base a la homología de aminoácidos existente desde Gly<sub>294</sub> a Glu<sub>337</sub> de Eco PolI y Gly<sub>275</sub> a Glu<sub>317</sub> de Spn PolI. El sitio de proteólisis de Eco PolI se situa en el par de residuos Thr<sub>323</sub>-Val<sub>324</sub> (Brown y cols, 1982), y respecto a Spn PolI se mantendría un aminoácido idéntico (Thr) y otro con una cadena lateral alifática (Ile).

## LA DNA POLIMERASA I DE *S. PNEUMONIAE* PERTENECE A LA FAMILIA A DE POLIMERASAS

Se han determinado nuevas secuencias de DNA polimerasas durante el desarrollo de nuestro trabajo experimental y después de la realización de la primera comparación entre las polimerasas de *S. pneumoniae*, *E. coli*, y la polimerasa y exonucleasa del fago T7 (López y cols, 1989). Por otra parte, se ha ampliado el conocimiento de los residuos importantes a nivel catalítico y estructural en los dominios enzimáticos de Eco PolIK, seleccionado como modelo para otras polimerasas (revisado en Joyce, 1991). Nos proponemos en este apartado de la Discusión comparar la secuencia de aminoácidos de Spn PolI con algunas de las DNA polimerasas de la familia A, mediante el programa DOTPLOT (Fig. 46). El grupo de polimerasas de la familia A esta constituido actualmente por las polimerasas bacterianas, Eco PolI, Spn PolI y Taq Pol, las DNA polimerasas inducidas por los colifagos T7, T5 y SP02, y la DNA polimerasa mitocondrial de levadura (MIP1) (Ito y Braithwaite, 1991). Dentro de esta comparación nosotros hemos incluido las exonucleasas de los colifagos T5 y T7, por la relación existente entre las secuencias T7 Exo/Spn PolI, y T5 Exo/Eco PolI (López y cols., 1989; Leavitt e Ito, 1989). En la Fig. 46 se muestran los "dotplot" de la comparación de Spn PolI con Eco PolI, Taq Pol, T5 Pol, T7 Pol, SP02 Pol, T5 Exo y T7 Exo (Fig. 46A, B, C, D, E, F y G). En los gráficos obtenidos hemos resaltado los bloques de homología significativos, éstos han sido extraídos del alineamiento de las secuencias mediante el programa ALING (Fig. 47). La relación entre las secuencias de aminoácidos de Spn PolI y Eco PolI (Fig. 46A) es bastante considerable, ya que como se puede observar son numerosos los bloques de homología, que se distribuyen desde el extremo amino al carboxilo de la proteína. Las secuencias homólogas están situadas preferentemente en las regiones amino (hasta el residuo 310 de Spn PolI) y carboxilo terminales (desde el residuo 465). Los bloques de homología se distribuyen en una línea diagonal, pero también se pueden observar en otras zonas del gráfico, aunque estos últimos bloques carecen de relevancia en la comparación, como se muestra en el alineamiento de las secuencias con el programa ALIGN (Fig. 47). La comparación de Spn PolI y Taq Pol (Fig. 46B) muestra la relación de secuencia de las dos proteínas, similar a la observada en la Fig. 46A. Al igual que en ésta, en la zona central de la comparación (residuos 240-350 de Spn PolI) desaparecen los bloques de homología. Las tres DNA polimerasas bacterianas de la familia A, Eco PolI, Spn PolI y Taq Pol, poseen un número diferente de aminoácidos, 928, 877 y 832, respectivamente. Las diferencias de masa de estas polimerasas se resuelven en la zona central de los gráficos, permitiendo un perfecto alineamiento de las regiones amino y carboxilo de las tres proteínas. Las comparaciones binarias de Spn PolI y las polimerasa fágicas (T5, T7 y SP02) (Fig. 46C, D y E) muestran menor homología que la observada con las polimerasas bacterianas. Los bloques de secuencias conservados están localizados en la mitad carboxilo terminal de Spn PolI y en los dos tercios carboxilo terminal de las polimerasas de T5, T7 y SP02. La ausencia de homología entre las regiones amino terminales de las tres proteínas y Spn PolI refleja la



**Fig 46. Representaciones gráficas de las comparaciones binarias de Spn Pol I con otras polimerasas y exonucleasas pertenecientes a la familia A.** En la parte superior y a la izquierda de cada gráfico se muestra la identidad de las proteínas comparadas. Spn Pol I, DNA polimerasa I de *S. pneumoniae*; Eco Pol I, DNA polimerasa I de *E. coli* (A); Taq Pol, DNA polimerasa de *T. aquaticus* (B); T5 Pol, DNA polimerasa del bacteriófago T5 (C); T7 Pol, DNA polimerasa del bacteriófago T7 (D); SPO2 Pol, DNA polimerasa del bacteriófago SPO2 (E); Spn PolIn350, derivado de Spn Pol I que contiene 350 aminoácidos del extremo amino terminal; T5 Exo, exonucleasa del bacteriófago T5 (F); T7 Exo, exonucleasa del bacteriófago T7 (G). La comparación se realizó mediante el programa DOTPLOT, realizándose el análisis a un 30% (A-F) y un 25% de homología (G). En los gráficos se indica en trazo más grueso los bloques de homología significativos respecto al alineamiento mostrado en la Fig. 47.



ausencia de actividad exonucleásica 5'→3' en T5 Pol, T7 PolI y SP02 Pol.

La comparación de los 350 aminoácidos del extremo amino terminal de Spn PolI (Spn PolIn350) con la exonucleasa del fago T5 (Fig. 46F) muestra 4 zonas de homología significativa que se extienden desde el residuo 50 al 260 de Spn PolI. La comparación de las secuencias Spn PolIn350 y T7 Exo se realizó a distintos porcentajes de homología. En las condiciones utilizadas en las anteriores comparaciones binarias (30%) no se observó ningún bloque conservado (dato no mostrado). Las comparaciones realizadas a porcentajes de homología del 29% al 26% (dato no mostrado), solo se detectaban 2 zonas conservadas, y únicamente la situada más próxima al extremo amino terminal era significativa teniendo en cuenta el alineamiento de la Fig. 47. Por último, analizamos la similitud de las secuencias a un 25% de homología, se obtuvieron 27 regiones, de las cuales 4 eran significativas, y se indican en línea gruesa en la Fig. 46G. Estos resultados demuestran una mayor homología de secuencia del extremo amino terminal de Spn PolI con la exonucleasa del fago T5, siendo más divergentes las secuencias de Spn PolIn350 y T7 Exo.

Después de la comparación macroscópica de estas polimerasas y exonucleasas, hemos realizado un análisis más detallado mediante el programa ALING. Spn PolI fue alineada con cada una de las polimerasas (Eco PolI, Taq Pol, T5 Pol, T7 Pol y SP02 Pol) y exonucleasas (T5 Exo y T7 Exo), posteriormente hemos unificado todas las comparaciones para conseguir la máxima homología entre todas las proteínas (Fig. 47). En 1991, Ito y Braithwaite han realizado una clasificación de todas las polimerasas secuenciadas y han comparado las secuencias de aminoácidos de cada familia. El alineamiento de la familia A de polimerasas no incluye las exonucleasas de los fagos T5 y T7, y no realiza ninguna comparación de las regiones amino terminal de las polimerasas bacterianas, sin embargo amplía el número de polimerasas alineadas introduciendo dentro de esta familia la polimerasa mitocondrial de levaduras (Mip1).

El porcentaje de residuos conservados es diferente en cada una de las zonas de las polimerasas. Si analizamos el número de residuos conservados en los 260 ó 300 aminoácidos del extremo amino terminal de las polimerasas bacterianas y exonucleasas fágicas (T5 y T7), observamos que un 28% de aminoácidos están conservados. Este porcentaje es levemente inferior si analizamos los 350-450 residuos del extremo carboxilo, aproximadamente un 23% de los residuos están conservados. Los aminoácidos situados entre estos límites en la región central, presentan muy poca similitud entre las polimerasas, únicamente existen varias zonas denominadas Exo I, II y III (Bernad y cols, 1989; Reha-Krantz y cols, 1991; Reha-Krantz, 1992; Blanco y cols, 1992). Las polimerasas de *S. pneumoniae* y *T. aquaticus* carecen de actividad exonucleásica 3'→5' (este trabajo; Tindall y Kunkel, 1988), aunque mantienen algunas de las regiones conservadas. Esta diferencia entre las tres polimerasas bacterianas podría indicar que el gen *polA* parental estaría compuesto de dos dominios, exonucleásico 5'→3' y polimerásico, y posteriormente en la evolución se introdujo en el gen *polA* de *E. coli* el dominio de actividad exonucleásica 3'→5'. Una hipótesis alternativa es que los tres dominios estuvieran presentes en el gen *polA* parental y debido a un menor requerimiento de actividad correctora

Sp02 Pol -----  
 T7 Pol -----  
 T5 Pol -----  
 Spn Poli -----MDKKKLLLI-DGSSVAFRAFFALYQQLDRFKNAAGLHTNAI-----YGFQLMLSHLLERVEPSHILVAF-DAGKITF 70  
 Eco Poli -----MVQIPQNPLILV-DGSSYLRYRAYHAFPP-----LTNSAGEPTGAM-----YGVNLMLRSLIMQYKPTHAAVVF-DAKGTFF 69  
 Taq Pol -----MRGMLPLFEPKGRVLLV-DGHHLAYRTFHAL-----KGLTTSRGEVPQAV-----YGFAKSLKAL-KEDGDVAVVVF-DAKAPSF 73  
 T5 Exo MSKSWGKFIEEEEEMASRRNLMIIV-DGTLNGFRFKHNSKPPASS-----YVSTIQSLAKSYSAR---TTIVLG-DKGSVVF 74  
 T7 Exo ---MALLDLKQFYELREGCDDRGILVMDGDNLVFPQMSAAEFDASWEEIWHRCCHAKARQILEDSEIKSYETRRKAWAGA-----PIVLAFTDS---VNW 90  
 Aa Idént DG Y D

Sp02 Pol -----  
 T7 Pol -----  
 T5 Pol -----  
 Spn Poli RTEMYAD-YKGR-----AKTPDE--FREQ-PPFIRELLD--HMGIHRYELAQYEADDIIGTLDKLA-EQDGFDTITVSGDKDLIQLTDEHTVVEISKKG 158  
 Eco Poli RDELFEH-YKSHR-----PPMPDD--LRAQ-IEPLHAMVK--AMGLPLLAVSGVEADDVIIGTLAREA-EKAGRPMVLISTGDKDMAQLVTPN---ITLIN 153  
 Taq Pol RHEAYGG-YKAGR-----APTPE--FPRQ-LALIKELVD--LLGLARLEVPGYEADDVLASLAKKA-EKEGYEVRIITADKDLQLLSDR---IHLVHPE 159  
 T5 Exo RLEHLEPE-YKGRNDEKYAQRTEEEKALDEQFFELYKDAFELCKTFTPTFTIRGVEADDMAAYIVKLI-GHLYDHVWLIISTDGDWDTLLTDK-VSRFSFTT 171  
 T7 Exo RLEHLEPE-YKGRNDEKYAQRTEEEKALDEQFFELYKDAFELCKTFTPTFTIRGVEADDMAAYIVKLI-GHLYDHVWLIISTDGDWDTLLTDK-VSRFSFTT 171  
 Aa Idént R E YK R E DD D D

Sp02 Pol -----  
 T7 Pol -----  
 T5 Pol -----  
 Spn Poli VAEFEAFTPDYLMEEEMGLTPAQFIDLK-ALMGDKSDNIPGVTKVGE-KTG-IKLLLEHGSLEGYI--ENIDGM--KTSK-MKENLINDKEQAFLSKTLA 249  
 Eco Poli TMTNTILGPEEVVKNYGVPPPELIDFL-ALMGDSSDNIPGVPGVGE-KTA-QALLQGLGLDLYAEPEKIAGLSFRGAKTMAAKLEONKEVAYLSYQLA 250  
 Taq Pol --GY-LITPAWLWEKYGLRPDQWADYR-ALTGDESDNLPQVKGIGE-KTA-RKLLLEWGSLEALL--KNLDR--KPA--IREKILAHMDDLKLSWDLA 246  
 T5 Exo RREYH-LRDMYEHMVD-DVEQFISLK-AIMGDLGDNIRGVEGIGA-KRG-YNIIREFGNVLDII--DQLPLP--GKQK-YIQNLNASEELLFRNLILV 260  
 T7 Exo LTQTEESADWHLFQTIKGDITDGYSGIAGWGDTAEDFLNPPITEPKTSVLKSGKNKGVEITKVVWRDP-----EPHETLWDCIKSIGAKAGMT 269  
 Aa Idént A GD K G

Sp02 Pol -----M 1  
 T7 Pol -----  
 T5 Pol -----  
 Spn Poli DFVILVGAEPFLYFAGKXGIGDYTGKRVYNGYANWIASISPAQLHFKEPKPVFDTAVENIHDIIINGREKIAKAGDYRPIITDPDEAEYIKMVYNMVIG 133  
 Eco Poli TIDTKAPIAIGLEDL-----  
 Taq Pol TIKTDVLELTCEQLEVQQAEEELGLFKYEFKRWADVE-AGKWLAQAKGAKPAKQETSVADEAPEVATVVISYDNYVTILDEETLKAWIAKLEKA 349  
 T5 Exo KVRTDLPLEVDFA-----  
 T7 Exo DLPTYCVDIAAAGQDVLKDKFKDILEIAEQ-----  
 Aa Idént EEDIIKQGMARILRFNEYNFIDKEIYLWRP----- 300

Sp02 Pol KTLSDIETF-SSVDLLKAGVYAYTEAPDFEILLFAYAFDDDPVKII-DLAQGDITLPEHVLVALTSSKV--IKTAYNA-NFERTCIAKH-FNLMLLPAQW 95  
 T7 Pol -MIVSDIEAN-ALLESVTKFHC-----GVIYDYSTA-EY-VSYRPSD-----FGAYLDALEAEVARGGLIVFHNGHKYDVPALTKLAKLQLNRE--F 81  
 T5 Pol PV-AFDSETS-ALYCRDGYLL-----GVSISHQ--EYQGVYIDSDCLT-EVAVYYLQKILDSENHT--IVFHNL-KFDMHFYKYHLGLTFD---K 212  
 Spn Poli VYSGPDVENL-GKFDYEMGFQKQLKQALNMSSADVAEGL-DFTIV---DQISQDMLSEESIHFHE-----LFGENY-BTDNLVGFVAW-----SC 341  
 Eco Poli PVFAFDIETD-SLDNISANLVGLSFAIEPGVAAYIPVAHDYLD---APDQISRERALELL-KPLEDEKA-LKVGQNL-KYDRGILANYGIELRG---IA 439  
 Taq Pol KRREPRDRERLRAFLERLEFGSLLH-----EFGLESKALEEAP-----WPPPEGA 305  
 T5 Exo -----  
 T7 Exo -----  
 Aa Idént D E D N

Sp02 Pol RCTAVHAT-TLGLPG-NLD-----GVAKALKLSAQKDKAGKALIRYFVSPCKPTKANGQRVRLNPEHDPEKW---EKFKVYC 167  
 T7 Pol HLPRENCIDTLVL-S-RLIHSNLKDDTMGL-LRSGKLPGRFGSHALEAWGYRLGEMKGEYKDDFKRMLLE-QGEEYVDGMEWVNFNE---EMM-DYN 171  
 T5 Pol AHKERRLHD--TMLQHYVLDERR-----GTHGLKLSLA---MKYTDMDGYDFELDKFKDODYCAHKIKKEDFTYDLIPFDIMWPYA 287  
 Spn Poli GDQLYATDKLELLQDPFIFKDFLEKTSLRVYDFKRVKVLQPFQVGLQAPAFDIRLAKYLLSTVED-NEIATIAS-----LYGQTYL 421  
 Eco Poli FDTMLESYILNSVA-----GRHDMS--LAERWLKHKITIFEEIAGKGNQLTFNQIAL-----EAGRYA 498  
 Taq Pol -FVG--FVLSRKEPMWLDLALAAARG-----GRVHRAPEPKALRDLKEARGLLAKDLS---VLALREGLGLPPGDD---PMLLAYL 379  
 T5 Exo -----  
 T7 Exo -----  
 Aa Idént G Y

Sp02 Pol IQDVEVERAIKNR-ISKFEPEL-SEHKLWALDQ---EINDRGVRIIDVDLVKHAICACDEQYQAGL----- 226  
 T7 Pol VQDVVVTKALLEKLLSDKHYPPEIDFTDVGYYTFWSESLEAVD-IEHRAAWL---LAKQRNGFPFDTKAI-----EEL--YVELA---ARRSE--L 253  
 T5 Pol AKDTRDATIRLHNFLLPKIEK---NEKLSLYYDVLMPGCVFLQR-V---EDRGVPSIDRLKEAQYQL-----TH 350  
 Spn Poli VDDETFYGKGVKKAIPEREK---FLEHLACKLAVLVETEPILLEKL--SENGQLELLYDMEQPLA-----FVLA 485  
 Eco Poli AEDADVTQLHLKMWPDQLQ-----HGKPLNVFENIEMPLVVP---LSRIERNVGIKIDPKVLHNS--EEL--TLRLA-ELEKK----- 569  
 Taq Pol L-DPSNTTPE-----GVARRYGEWT-----EEAGERAALSERLFANL---WGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLA 442  
 T5 Exo -----  
 T7 Exo -----  
 Aa Idént D

Sp02 Pol -----IA-EAKKLTG-LPNPNSTAQLKKWLE 250  
 T7 Pol LRKLTETFGSWYQPKGTEMFCHPRTGKPLPKYPRIKTPKVGIFKPKPKNAQREGREPCELDTREYVAGAPYTPV-EHVV---F-NPSSRDHIQKQLQ 347  
 T5 Pol NLNKAREKLYTYPEVKQLEQ-----DQNEA-----F-NPNSVKQLRVLLF 389  
 Spn Poli KMEIAGIVVKKTEFLLEMQAENELVIEKLTQEIYE-----LAGEE-----F-NVNSPKQLGVLLF 538  
 Eco Poli AHE-----IAGEE-----F-NLSSTKQLTILF 591  
 Taq Pol HMEATGVRLDVAYLRLALSLEVAEETARLEAEVFR-----LAGHP-----F-NLNSRDQLERVLF 495  
 T5 Exo -----  
 T7 Exo -----  
 Aa Idént N S L

Sp02 Pol	EK-GLTISSLA-KDKIEE-LIENTNDETVHRVL-RLRQEMAKTSVKKYLAMEKA-LCPDNRV-----RG---LLQFYGASRTGWA	411
T7 Pol	E-AGWV-PTKY-TDKGAP-----VVDDEVL-EGVRVDDPE-KQAAIDLIKEYLMIQKRIG---QSAEGDKAWLRYVAEDGKIHGSVNPNGAVTGRAT	411
T5 Pol	DYVGLT-FTGKLTDTGAD-----SIDAEALNELATQH-PI-AKTLEI-RK-LTKLISTYVEKILLSIDA-----DGCIRTFPHEHMTTSGRLS	413
Spn PolI	EKGLL--PLEY-TKTKTKGY-----STAVDVL-ERLAPIAPI-VKKILDY-RQ-IAKIQSTYVIGLQDWILA-----DGKIHTRYVQDILTQTGRLS	417
Eco PolI	EKQGIK-PLKK-TPGGAP-----STSEEVN-EELALDYPL-PKVILEY-RG-LAKLKSTYTDKLPMLNPK-----TGRVHTSYHQAVTATGRLS	470
Taq Pol	DELGL--PAIGKTEKTGKR-----STSAAVL-EALREAHPIVEK-ILQY-RE-LTKLKSTYIDPLPDLIHPR-----TGRLHTRFNQTATATGRLS	575
T5 Exo	-----	
T7 Exo	-----	
Aa Idént	G L L G GR	
Sp02 Pol	GRLVQVQNLPNKIEDL-DTARNLLKGGHYEAI--ELLYGQVPFVLSQLVRTAFIPSEGNEFYVS-DFSAIEARVIAWLAG--EWRLEVF----NTHG	412
T7 Pol	HAFP---NL-AQIPGV--RSPYGEQCRAAFGA---EHHLDTGKTPW-----VQAGIDASGLELRCLAHFMAFDNGEYAEHLNG-DIHT	507
T5 Pol	SSGKL--NL-QQLPRDESIKGCVVAPPYRVIAWDLTTAEVYAA-----VL-SGD-RNMQ-QVFINMRN--EPDKYP----DFHS	538
Spn PolI	SVDP---NL-QNIP---ARLEQGRLIRKAF-VPEWEDS-----VLLSSDYSQIELRVLAHISK--DEHLIKAFQE-GADIHT	683
Eco PolI	STDP---NL-QNIP---VRNEEGRRIRQAF--IAPEDY-----VIVSADYSQIELRIMAHLSR--DKGLLTAFAE-GKDIHR	735
Taq Pol	SSDP---NL-QNIP---VRTPLGQRIRRAF--IA-EEGW-----LLVALDYSQIELRVLAHLSG--DENLIRVFQE-GRDIHT	640
T5 Exo	-----	
T7 Exo	-----	
Aa Idént	NL D H	
Sp02 Pol	KIYEASAAQMFKVPVESITKGSPLRQKGVKVAELALGYQG-GKGALIQMGALNMGLAEGELPELVKAWRTANKKIVKFWYDVEAAAIKAVKERKPVKLQHG	511
T7 Pol	KNQI---NL-AQIPGV--RSPYGEQCRAAFGA---EHHLDTGKTPW-----VQAGIDASGLELRCLAHFMAFDNGEYAEHLNG-DIHT	576
T5 Pol	NIAHNVFKLQCEPRDVK-KLFPALRQAAKAITFGILY-GSGPAKVAHSVNEALLEQAAKTGEPFVECTVADAKE---YIETYFGQFPQLKRWIDKCHDQ	632
Spn PolI	STAMRVFGIERPDNV---TANDRRNAKAVNFGVY-GISDFGLSNNLISRKEAKA-----YIDTYFERFPQIKNYMDEVVRE	757
Eco PolI	ATAAEVFLPLETVT---SEQRSSAKAINFGLIY-GMSAFGLARQLNIPRKEAQK-----YMDLYFERYPGVLEYMERTRAQ	808
Taq Pol	ETASWMPFVPREAVD---PLMRAAKTINFGVLY-GMSAHLR-SQEL-AIPYEEAQA-----FIERYFQSFPPKVRANIETLEE	713
T5 Exo	-----	
T7 Exo	-----	
Aa Idént	R K Y	
Sp02 Pol	LTFLYESGILFVQLPSG-RRLAYAKPKLELDE--RFGKEALTYEGKLESGKWRNLNTYCGKLVENIVQATARDCLAITLMLRDNAGYKTMVH-----	601
T7 Pol	SQWVAGEQVQVW---KRRWIK---GLDG--RKVH---VRSPhAAL--NTLL-----QSAGALICKLWI IKTEEMLEVKLKHGWGDGFA	649
T5 Pol	IKNHGFIYSHFGRK---RRLHN---IHSED--RGVQ---GE-EIRSG-FNAII-----QSASSDSSLGAVDADNEIISLGLEQEMKIVML	705
Spn PolI	AROKGYVETLF---KRRREL---PDINSRNFNIR---GFAEATAI--NSPI-----QGSAAIDILKIAMIQLDKALVAGGYQTKMLLQ--	829
Eco PolI	AKEQGYVETLDG---RRLYL---PDIKSSNGARR---AAAERAAI--NAPM-----QGTAAIDIKRAMIAVDALWQAEQPRVRMIMQ--	880
Taq Pol	GRRRGYVETLFG---RRRYV---PDLEARVKSVR---EAAERMAF--NMPV-----QGTAAIDLMKLMVVKLFRLEEMG--ARMLLQ--	783
T5 Exo	-----	
T7 Exo	-----	
Aa Idént	RR N Q	
Sp02 Pol	----VHDEA-VLDVPRGKNELDKVEAIMGEPISWAKGLPLTADGFV---TDYYKGD-----	648
T7 Pol	YMAWVHDEIQVGCRTTEEIAQVVIETAQEAAMRWVGDHWNFRCLLDTGKMGPNWAICH-----	704
T5 Pol	----VHDSV-VAIVREDLIDQYNEILIRNIQKDRGISIPGCGIGIDSDSEAGGSRDYSCKGKMKKQHPISACIDDDEYTRYVKGVLLDAEFYKLLAAMDK	800
Spn PolI	----VHDEI-VLEVPKSELVEMKLVKQTMEEAIQLSVPLIADENE---GATWYEAQ-----	877
Eco PolI	VHDEL-VFEVHKDDVDAAKQIHLMENCTRLDVLPLEVVGSG--GENWDQAH-----	877
Taq Pol	----VHDEL-VLEAPKERAEAVARLAKEVMGEGVYPLAVPLEVEVGI---GEDWLSAKE-----	928
T5 Exo	-----	
T7 Exo	-----	
Aa Idént	VHD V	
Sp02 Pol	-----	
T7 Pol	-----	
T5 Pol	EHPDHSKYKDDKFIIVCKDLDNVVKRILGA 829	
Spn PolI	-----	
Eco PolI	-----	
Taq Pol	-----	
T5 Exo	-----	
T7 Exo	-----	

**Fig 47. Comparación de las DNA polimerasas pertenecientes a la familia A de polimerasas.** SP02 Pol, DNA polimerasa del bacteriófago SP02; T7 Pol, DNA polimerasa del bacteriófago T7; T5 Pol, DNA polimerasa del bacteriófago T5; Spn PolI, DNA polimerasa I de *S. pneumoniae*; Eco PolI, DNA polimerasa I de *E. coli*; Taq Pol, DNA polimerasa de *T. aquaticus*; T5 Exo, exonucleasa del bacteriófago T5; T7 Exo, exonucleasa del bacteriófago T7. Se muestra de izquierda a derecha y de arriba a abajo la secuencia de aminoácidos de las proteínas desde el extremo amino al extremo carboxilo terminal. Se indican los números de los residuos situados a la derecha de cada una de las líneas. Los guiones representan la ausencia de los residuos correspondientes. Los bloques en negrita muestran aminoácidos conservados según la matriz de homología mostrada en Métodos, indicándose los aminoácidos idénticos en la línea inferior de cada alineamiento.

en el caso de *S. pneumoniae* y *T. aquaticus* dicha actividad se hubiera perdido durante la evolución. Los datos de comparación de secuencias de aminoácidos parecen indicar que la segunda hipótesis es más plausible. Blanco y cols, (1992) situaron en Spn PolI las tres regiones Exo I, II y III, conservadas en las polimerasas con actividad exonucleásica 3'→5', la distancia entre estos dominios es similar al detectado en otras polimerasas. Para realizar este alineamiento en Spn PolI es preciso introducir una delección de 84 aminoácidos delante del dominio Exo I de Spn PolI. En la comparación de la Fig. 47 Taq Pol presenta los dominios Exo I y III, careciendo de 86 aminoácidos presentes en Eco PolI delante de la región Exo I. La carencia de aminoácidos y la ausencia de residuos conservados en Spn PolI y Taq Pol podrían ser responsables de la ausencia de actividad exonucleásica 3'→5' en estos polipéptidos. La región intermedia aun presente mantendría separados tridimensionalmente los dominios amino y carboxilo de Spn PolI, de forma similar a Eco PolI (Ruscitti y cols, 1992). Este dominio intermedio contendría el sitio de proteólisis y podría proporcionar alguna otra característica al polipéptido, como por ejemplo, el desplazamiento de hebra en la polimerización, ya que en la DNA polimerasa del fago  $\phi 29$  se ha demostrado que mutaciones en el dominio de actividad exonucleásica 3'→5' (región Exo III) alteran su actividad de desplazamiento de hebra (Soengas y cols, 1992). En el caso de Spn PolI se ha comprobado que dicha actividad helicasa está incluida en su región carboxilo terminal, ya que el derivado Spn PolIc269 posee esta actividad (Pons y cols, 1991) y contiene parte del dominio Exo I, e íntegras las regiones Exo II y III.

La polimerasa más estudiada de la familia A es Eco PolI, distintos autores han analizado los residuos que interaccionan con el DNA, dNTP y cationes, los implicados en procesividad y catálisis de la actividad polimerásica (Basu y Modak, 1987; Basu y cols, 1988; Catalano y cols, 1990; Polesky y cols, 1990; revisado en Polesky y cols, 1992). Otros autores se han centrado en el estudio de la actividad exonucleásica 3'→5' de Eco PolI, indicando los aminoácidos coordinados con el metal A y B, los que sitúan al sustrato correctamente y favorecen la desnaturalización del DNA (Freemont y cols, 1988; Derbyshire y cols, 1988, Derbyshire y cols, 1991). Otros datos de Eco PolI revelan los residuos que al ser modificados alteran la actividad enzimática o las características del proceso (Joyce y cols, 1985). En el alineamiento de la Fig. 47 se pueden localizar todos los aminoácidos importantes de Eco PolI. En el dominio exonucleásico 5'→3' de Eco PolI, Joyce y cols, (1985) han caracterizado cuatro mutaciones. Dos de ellas (*polA107* y *polA480ex*) afectan exclusivamente a la actividad exonucleásica 5'→3'. En las otras dos (*polA4113* y *polA214*) la mutación repercute también en el dominio polimerasa. Si se analizan las posiciones de estas mutaciones y se estudia la conservación de residuos en las distintas polimerasas bacterianas y exonucleasas fágicas, se puede observar que las posiciones Tyr<sub>77</sub> y Gly<sub>184</sub> (*polA107* y *polA480ex*) están presentes en todos los polipéptidos, sin embargo los residuos Gly<sub>103</sub> y Gly<sub>192</sub> (*polA4113* y *polA214*) de Eco PolI solamente son mantenidos en las polimerasas bacterianas. Las exonucleasas fágicas, en esas posiciones poseen aminoácidos no conservados. Estos datos indican que los residuos de las posiciones 103 y 192 son importantes en polipéptidos con las dos actividades enzimáticas

(exonucleásica y polimerásica), pudiendo ser modificados en polipéptidos con actividad exonucleásica 5'→3' exclusivamente. Las mutaciones en las posiciones 103 y 192 de Eco PolI probablemente afectan a la estructura o estabilidad del polipéptido que presenta la actividad exonucleásica 5'→3' acoplada al dominio polimerasa. En los residuos 690 y 850 de Eco PolI se sitúan las mutaciones *polA6* y *polA5*, los polipéptidos alterados modifican su interacción con el DNA y tienen disminuida la procesividad del dominio polimerasas, respectivamente. Los residuos Arg<sub>690</sub> y Gly<sub>850</sub> de Eco PolI están conservados en las polimerasas bacterianas. Las polimerasas fágicas (T5, T7 y SP02) probablemente presentan ciertas características diferentes respecto a la bacterianas, ya que muestran una procesividad distinta y su interacción con el DNA está mediada en algunos casos por proteínas accesorias, como en la polimerasa del fago T7. Estas características deben modificar las interacciones de la polimerasa con el DNA, siendo más permisible la alteración de esas posiciones.

De forma similar, hemos analizado la presencia de otros residuos del dominio polimerasa de Eco PolI en el resto de polimerasas de la familia A. Los residuos que interactúan con el DNA ó dNTP (Arg<sub>668</sub>, Asp<sub>705</sub>, Glu<sub>710</sub>, Lys<sub>758</sub>, Tyr<sub>766</sub>, Arg<sub>841</sub>, Asn<sub>845</sub>, Gln<sub>849</sub>, Asp<sub>882</sub>, Glu<sub>883</sub>) en Eco PolI están presentes en todas las polimerasas analizadas, excepto Arg<sub>841</sub> que muestra modificaciones no conservativas en Spn Pol, T5 Pol, T7 Pol y SP02 Pol, y Glu<sub>883</sub> que es una Ser en T5 Pol. El aminoácido Lys<sub>635</sub> de Eco PolI implicado en la procesividad de la actividad polimerásica es idéntico en las polimerasas bacterianas, presentando cambios no conservativos en las polimerasas fágicas. De forma similar el residuo Arg<sub>682</sub>, relacionado con la catálisis del pirofosfato inorgánico del dNMP sustrato, está modificado en T5 Pol y SP02 Pol. Por último el grupo de aminoácidos de Eco PolI que promueven la catálisis en la reacción de polimerización (Arg<sub>668</sub>, Asp<sub>705</sub>, Gly<sub>767</sub>, Gln<sub>849</sub>, Asp<sub>882</sub>) están conservados en todas las polimerasas analizadas. Estos resultados sugieren que en la evolución los aminoácidos de las polimerasas que interactúan con el DNA, dNTPs e intervienen en la catálisis no se han modificado.

## ACTIVIDAD EXONUCLEASICA 5'→3' DE SPN POLI

### Productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI

Las actividades exonucleásicas 5'→3' de las DNA polimerasas tipo I generan mono y oligonucleótidos de diferente tamaño. Sin embargo, cada una de ellas presenta ciertas particularidades en cuanto a la talla y porcentaje de producción de los oligonucleótidos, la preferencia por los sustratos mono y bicatenario y el catión divalente óptimo.

Los productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI son mono-, di-, tri- y 10-mer oligonucleótidos. El producto mayoritario generado por Spn PolI es dNMP, liberándose de forma minoritaria un oligonucleótido 10-mer. Taq Pol libera principalmente mono- y dinucleótidos, en una proporción de un 90% y 10%, respectivamente (Longley y cols,

1990). La actividad exonucleásica 5'→3' de Eco PolII genera de un 5 a un 25% de oligonucleótidos, siendo el resto mononucleótidos (Cozzarelli y cols, 1969). Sin embargo a diferencia de Spn PolII, la producción de oligonucleótidos mayores de 4-mer es inferior al 1% (Setlow y Kornberg, 1972). Este tipo de productos degradativos se incrementa en reacciones acopladas de polimerización (Cozzarelli y cols, 1969; Lundquist y Olivera, 1982; Ott y Eckstein, 1987). Así mismo para Taq Pol, en esta clase de reacciones se estimula 3 veces la producción de mononucleótidos, aunque no produce oligonucleótidos de talla superior a 2-mer (Longley y cols, 1990). En Spn PolII la actividad exonucleásica se estimula levemente en presencia de dNTP. Este resultado podría ser adscribible al diferente catión divalente requerido en las reacciones exonucleásica y polimerásica de Spn PolII, contrarrestándose la probable estimulación de la actividad exonucleásica 5'→3' por el descenso en un 70% de dicha actividad en presencia de MgCl<sub>2</sub>.

El sustrato preferido por la actividad exonucleásica 5'→3' de las DNA polimerasas tipo I es DNA bicatenario. Spn PolII reduce la producción de dNMP a un 25%, a partir de un sustrato monocatenario (oligonucleótido). Este porcentaje es solo de 1% para la actividad exonucleásica 5'→3' de Taq Pol. A diferencia de las polimerasas bacterianas, la exonucleasa D15 del fago T5, que presenta regiones de aminoácidos conservados con aquellas, genera mono-, di-, tri- y tetranucleótidos en similares proporciones y no muestra preferencia por la naturaleza del sustrato (Sayers y Eckstein, 1990).

El producto de menor talla acumulado no susceptible a la acción exonucleolítica de Spn PolII, prevaleciendo la disociación del enzima, es un oligonucleótido de 10-mer. Probablemente Eco PolII tampoco degrada este tipo de productos, ya que los oligonucleótidos acumulados por la acción exonucleásica 5'→3' no son convertidos a mononucleótidos a tiempos largos de incubación (Deutscher y Kornberg, 1969).

El oligonucleótido más frecuentemente generado por la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolII posee una talla de 10-mer. El derivado Spn PolIn351a, carente del dominio polimerasa, aumenta la proporción de este producto frente al mononucleótido. Esta característica no parece estar presente en la polimerasa de *E. coli*, Setlow y Kornberg, (1972) mostraron que el fragmento de proteólisis de 35 kDa de Eco PolII posee una actividad exonucleásica 5'→3' idéntica a la detectada con Eco PolII. Las diferencias en actividad exonucleásica de Spn PolII y sus derivados polipeptídicos de menor masa molecular no son solo detectadas en el procesamiento de oligonucleótidos, ya que el polipéptido Spn PolIn351a y el producto de proteólisis de 32 kDa de Spn PolII muestran mayor actividad que Spn PolII ó Spn PolIn620 sobre DNA de esperma de salmón en los geles de detección de nucleasas *in situ*. Es probable que este incremento en la detección sea debido a una producción mayor de oligonucleótidos a partir del sustrato, que se eliminarían más rápidamente del DNA de la matriz del gel, y por lo tanto la visualización de la actividad nucleásica de estos derivados puede estar sobrestimada. Esta sugerencia esta apoyada por la limitada detección de la actividad polimerásica del producto de 67 kDa de Spn PolII, unicamente hemos visualizado este derivado en una autorradiografía

sobrepuesta de la Fig. 38B. Aunque por otra parte, este derivado podría tener una actividad polimerásica muy disminuida respecto a Spn PolI, mientras que el producto de proteólisis de 32 kDa podría mantener una actividad similar al polipéptido parental.

### **Cinética enzimática de los productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' en función de la concentración de Spn PolI**

En este trabajo hemos analizado la producción de dNMP y oligonucleótido 10-mer en función de dosis crecientes de Spn PolI. Nuestros resultados indican que en la producción de dNMP a partir de un sustrato bicatenario, estarían implicadas 2 moléculas de Spn PolI, este número se incrementa a 4 moléculas de Spn PolI si el sustrato es monocatenario. Por otro lado, en la producción del oligonucleótido 10-mer se requerirían 2 moléculas de Spn PolI. Estos resultados sugieren que la formación de los productos siguen una función sigmoideal en función de la concentración de enzima (Fig. 48A, B y C), como en una cinética alostérica. Sin embargo esta hipótesis puede ser consecuencia de distintos artefactos del ensayo:

a) la latencia inicial de las curvas podría indicar la destrucción del sustrato durante la incubación a concentraciones de enzima en las que apenas hay liberación de producto. Esta posibilidad ha sido descartada ya que hemos comprobado la integridad del sustrato durante los ensayos en la muestra control.

b) la latencia podría ser consecuencia de la inestabilidad del enzima a baja concentración, sin embargo esta hipótesis se ha desestimado por la presencia de albumina de suero bovino (libre de nucleasas) a 0,5 mg/ml en la reacción.

c) el tipo de cinética observada puede estar determinada por la existencia de algún contaminante en el enzima. Nosotros hemos analizado el tipo de productos liberados por Spn PolI y sus derivados, y hemos utilizado varias preparaciones de Spn PolI. Los productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' han sido los mismos con los distintos polipéptidos y preparaciones analizadas.

d) la cinética sigmoideal de los productos de la actividad exonucleásica 5'→3' en función de la concentración de Spn PolI podría ser debida a una interacción preferencial de Spn PolI, a través de su dominio polimerasa, con el extremo 3'-OH del oligonucleótido sustrato. En este tipo de unión el sustrato no sería accesible al centro catalítico de la actividad exonucleásica y como consecuencia no se produciría la degradación en dirección 5'→3'. Si esta hipótesis es correcta, se requeriría una saturación de los sitios de unión en el dominio polimerizante previo a la interacción del sustrato con el dominio exonucleolítico. Nuestros resultados no permiten descartar esta hipótesis, ya que no hemos analizado las cinéticas a mayores concentraciones de sustrato. En estas condiciones si la actividad exonucleásica 5'→3' siguiera una cinética sigmoideal, no se alteraría el tipo de respuesta.

Algunas de estas explicaciones alternativas podrían dar curvas similares a las mostradas en la Fig. 48A, B y C, por lo tanto nuestros resultados han de ser considerados como indicativos

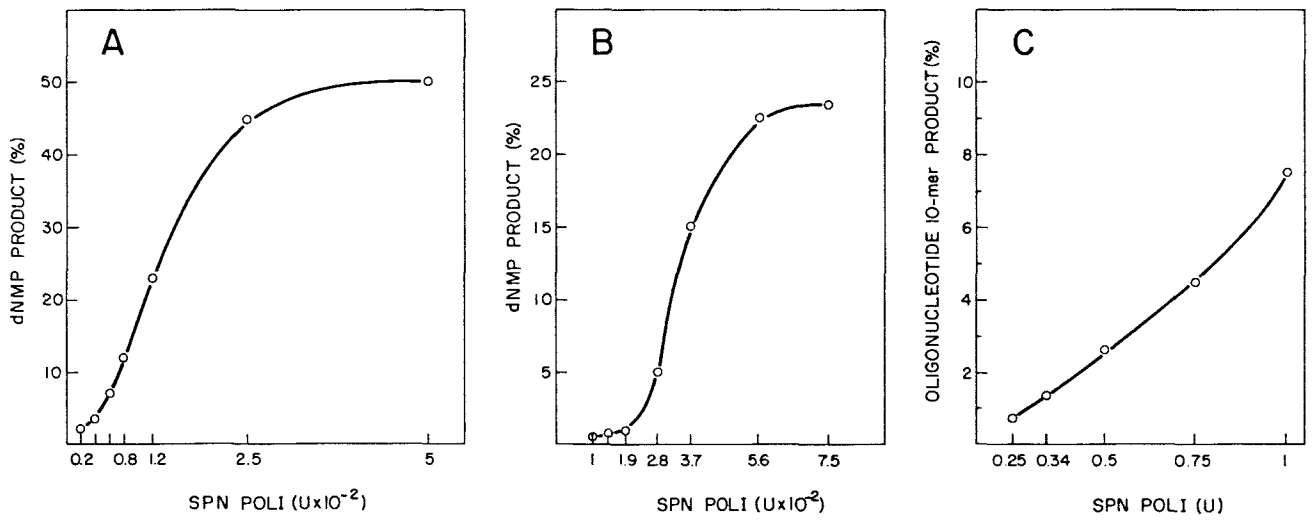


Fig. 48. Representación gráfica del porcentaje de producto dNMP (A y B) y oligonucleótido 10-mer (C) liberado a dosis creciente de Spn Poli, a partir de un sustrato bicatenario (A) y monocatenario (B y C). Las reacciones enzimáticas se realizaron en las mismas condiciones que se indican en la Fig. 24.



y no conclusivos. Independientemente la lenta transición observada en las cinéticas de los productos de la actividad exonucleásica de Spn PolII, no implica la existencia de cooperatividad, y si ésta existiera requeriría una transición molecular.

La cinética de las actividades exonucleásica 5'→3' de otras DNA polimerasas no ha sido analizada, sin embargo, si existen datos sobre la cinética de unión de dAMP a Eco PolII (Huberman y Kornberg, 1970). Estos autores detectaron una marcada curvatura en la representación de Scatchard, y postularon que podría existir entre las moléculas de Eco PolII heterogeneidad, en su capacidad de unión a dAMP. Cavalieri y cols, 1974, analizaron la cinética de la actividad polimerásica de Eco PolII. La tasa de síntesis de este enzima utilizando como molde (rA)<sub>n</sub>·(dT)<sub>10</sub> ó RNA natural varía sigmodialmente en función de la concentración de enzima. La cooperatividad es mostrada unicamente para la actividad transcriptasa reversa de Eco PolII y de la DNA polimerasa-RNA dependiente del virus tumoral de raton Mason-Pfizer. Estos autores demostraron que la unión del sustrato dNTP a Eco PolII sería cooperativa en cada uno de los monómeros de enzima, pero esta unión no influiría en la cinética sigmoideal de interacción del enzima con RNA. Papanicolaou y cols, 1986, sugieren la existencia de dos formas de Eco PolII que poseerían distinta tasa de actividad exonucleásica 3'→5' a polimerásica. De esta forma la capacidad correctora de Eco PolII sería una función sigmoideal de la concentración del sustrato. Por lo tanto, en determinados procesos enzimáticos *in vitro*, varias moléculas de Eco PolII pueden actuar cooperativamente y probablemente este comportamiento cinético tendría alguna transcendencia biológica *in vivo*. Así mismo, si la actividad exonucleásica 5'→3' mostrará una determinada cooperatividad *in vitro*, reflejaría la función biológica de dicha actividad en replicación cromosómica o reparación de daños en el DNA.

### **Actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolII en fragmentos de DNA**

La actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolII sobre fragmentos de DNA de 89 y 138 pb generó productos de una longitud de 20 y 40 nucleótidos, y en menor proporción oligonucleótidos 10-mer. Los experimentos realizados con Spn PolII y Eco PolII en este trabajo muestran una degradación preferente del sustrato monocatenario. Este resultado se opone a la especificidad de sustrato mostrada por la actividad exonucleásica 5'→3' de Eco PolII indicado por Setlow y Kornberg, (1972). Sin embargo, Lundquist y Olivera (1982) demostraron que el sustrato preferido por la actividad exonucleásica 5'→3' de Eco PolII es un DNA bicatenario con el extremo 5' desapareado. Este producto transitorio es generado por Eco PolII durante la reacción de desplazamiento de hebra, utilizando como sustrato una molécula de DNA bicatenario circular del fago  $\phi$ X174 con un "nick".

Así mismo, el enzima Taq Pol degrada preferentemente un sustrato de doble cadena parcialmente monocatenario en el extremo 5'. El enlace fosfodiéster hidrolizado está situado en la zona apareada del sustrato, adyacente a la región desplazada. La tasa de hidrólisis sobre este DNA, en ausencia de polimerización, aumenta de 15 a 20 veces respecto a un DNA bicatenario

con un "nick". Si la reacción exonucleolítica está acoplada a la polimerizante la tasa de hidrólisis sobre el sustrato bicatenario con el extremo 5' parcialmente monocatenario desplazado descende de 2 a 3 veces (Abramson y cols, 1992).

La preferencia de sustrato mostrada por la actividad exonucleasa 5'→3' de Spn PolII no puede explicarse por la parcial renaturalización del DNA monocatenario durante el desarrollo de la reacción a 37°C, ya que en uno de los fragmentos utilizados (138 pb) se purificó la hebra de DNA marcada en el extremo 3', mostrando la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolII la misma preferencia sobre este tipo de sustrato que sobre el DNA monocatenario desnaturalizado por calor. Sin embargo, no podemos desestimar la formación de zonas bicatenarias intracatenarias transitorias de baja energía, que estimularían la actividad exonucleásica 5'→3' sobre el DNA monocatenario.

La preferencia de la actividad exonucleásica 5'→3' por DNA monocatenario, quizás está relacionada con los resultados obtenidos de unión de Spn PolII a DNA en condiciones no catalíticas, en ensayos de retención en geles de poliacrilamida de un fragmento de DNA mono o bicatenario de 301 nt. El fragmento de DNA es retenido por la interacción con Spn PolII, observándose aproximadamente el mismo número de complejos DNA-proteína con DNA mono y bicatenario. Sin embargo, es mayor el número de moléculas de DNA monocatenario retenidas por Spn PolII. Estos resultados se pueden interpretar asumiendo una mayor afinidad de Spn PolII por DNA monocatenario. Este argumento puede ser válido si tenemos en cuenta los datos obtenidos por Englund y cols, (1969) con Eco PolII: dos moléculas del enzima se unen a un DNA bicatenario lineal, y aproximadamente 1 molécula de enzima se sitúa cada 200 nt en un DNA monocatenario. Estas interacciones indicarían la formación de distintos complejos en la unión de Eco PolII a DNA mono y bicatenario. Por el contrario, la interacción de Spn PolII con el sustrato mono ó bicatenario produce la misma clase de complejos, este hecho que podría ser consecuencia del tamaño del fragmento utilizado (301 pb). Otras posibles explicaciones del diferente comportamiento de los enzimas Spn PolII y Eco PolII, con los sustratos mono y bicatenario, podría ser atribuida a la interacción de distintos dominios de los enzimas con el DNA y a las distintas condiciones en las que se realizaron los ensayos con Eco PolII (Englund y cols, 1969) y Spn PolII. Nuestros resultados de interacción DNA-Spn PolII podrían ser adscribibles a la unión por el dominio con actividad exonucleásica 5'→3', ya que es posible observar tras la unión de Spn PolII al sustrato monocatenario la acción degradativa de la actividad exonucleásica 5'→3' (dato no mostrado), y además Spn PolIIc269, carente del dominio de actividad exonucleasa 5'→3', no produce ningún retraso de migración sobre los dos sustratos analizados. Sin embargo, la ausencia de unión de Spn PolIIc269 al DNA se podría explicar por una menor afinidad del polipéptido por el sustrato. Esta posibilidad es poco probable ya que la afinidad de Spn PolIIc269 por poli(dA).(dT)<sub>10</sub> es similar a la mostrada por la proteína parental (Pons y cols, 1991).

## ESENCIALIDAD DEL GEN POLA DE *S. PNEUMONIAE*

En este trabajo hemos analizado la viabilidad celular en estirpes de *S. pneumoniae* carentes del extremo 3' del gen *polA*. Esta región codifica para el dominio con actividad polimerásica, y es totalmente dispensable. En *E. coli* esta actividad de Eco PolII polimeriza las regiones no replicadas entre los fragmentos de DNA discontinuos de la hebra retrasada en la replicación cromosómica (revisado en Kornberg y Baker, 1992). En los mutantes de *S. pneumoniae* carentes de la actividad polimerásica de Spn PolII, se ha detectado solo un incremento de 5 min en el tiempo de división celular. Si asumimos un papel similar del dominio polimerasa de Spn PolII al demostrado en *E. coli*, sería necesaria la existencia de otras polimerasas que sustituyeran a PolII durante la replicación cromosómica. En este trabajo hemos obtenido evidencias de la presencia de otra DNA polimerasa en *S. pneumoniae*. En los mutantes *polA* carentes del dominio polimerasa de Spn PolII se ha detectado actividad polimerizante, así mismo mediante polimerización *in situ* se ha visualizado un polipéptido de aproximadamente 120 kDa presente en extractos crudos de las estirpes silvestre y mutantes *polA*. Este polipéptido podría ser la subunidad catalítica de Spn PolIII, tendría una masa molecular similar a la de PolIII de *E. coli* (132 kDa) que también fue detectada mediante polimerización *in situ* (Spanos y cols, 1981).

La actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolII es esencial para la viabilidad celular de *S. pneumoniae* en las condiciones de crecimiento celular analizadas. Este resultado sería equivalente al indicado por Konrad y Lehman (1974), Olivera y Bonhoeffer (1974) con mutantes letales condicionales de Eco PolII. Las mutaciones termosensibles *polA480ex* y *polA4113* en el dominio amino terminal del enzima impiden el crecimiento celular a la temperatura no permisiva. Posteriormente, Joyce y Grindley (1984) han demostrado que la esencialidad del gen *polA* de *E. coli* es dependiente de las condiciones de crecimiento bacteriano. En medio de crecimiento mínimo la proteína Eco PolII es enteramente dispensable, y sus funciones en replicación de DNA son realizadas por otras enzimas. Sin embargo, un mutante total *polA* no puede crecer en un medio rico, probablemente debido a que no se produce una sustitución eficaz de PolII en el elevado número de tenedores de replicación. La presencia de un derivado Eco PolII con actividad polimerásica o exonucleásica 5'→3' restaura la viabilidad celular de *E. coli* en un medio de crecimiento rico. En los mutantes *polA* se requeriría la acción de otras proteínas (PolII, PolIII, RNasa H) que sustituirían la actividad enzimática ausente de Eco PolII (Joyce y Grindley, 1984). La actividad polimerásica de Eco PolII sería sustituida por PolII y PolIII, que elongarían los fragmentos de Okazaki. La actividad exonucleásica 5'→3' de Eco PolII degrada en dirección 5'→3' los RNA "primer" de los fragmentos de Okazaki según ha sido demostrado en un ensayo *in vitro* por Wu y cols, (1992). En mutantes carentes de esta actividad otra exonucleasa debe procesar los fragmentos de Okazaki, que son posteriormente elongados y sellados por la actividad polimerásica de Eco PolII y por la ligasa de *E. coli*. La RNasaH es

capaz de degradar híbridos DNA-RNA, pero siempre deja de 1 a 3 ribonucleótidos en el extremo 5' de los RNA de los fragmentos de Okazaki (Kitani y cols, 1985). En ensayos de replicación cromosómica *in vitro* en presencia de Eco PolIK y DNA ligasa, la RNasa H no convierte los fragmentos de Okazaki en DNA de alto peso molecular (Wu y cols, 1992). PolII y el Holoenzima PolIII (Maki y Kornberg, 1985) carecen de actividad exonucleásica 5'→3'. Por lo tanto ninguno de los enzimas sugeridos por Joyce y Grindley (1984) podrían suplir la actividad exonucleásica 5'→3' en la replicación cromosómica, pero sin embargo esta actividad es dispensable para el crecimiento celular de *E. coli*. La imposibilidad de delecionar el extremo 5' del gen *polA* en *S. pneumoniae* en todas las condiciones analizadas (ralentizando el crecimiento del cultivo neumocócico, utilizando distintas estirpes) revela una situación diferente a la demostrada en *E. coli*. El absoluto requerimiento de la actividad exonucleásica 5'→3' de *S. pneumoniae* en la viabilidad celular sugiere que no existe otro enzima capaz de sustituir su función presumiblemente en la eliminación de "primers" de los fragmentos de Okazaki de *S. pneumoniae* durante la replicación cromosómica.

## **FUNCION DEL DOMINIO CON ACTIVIDAD POLIMERASICA DE SPN POLI EN LA TRANSFORMACION CROMOSOMICA Y PLASMIDICA**

Células de *S. pneumoniae* pueden ser transformadas de forma natural con DNA exógeno que contenga secuencias homólogas con el cromosoma neumocócico (Lacks, 1966). El DNA donador es incorporado en forma monocatenaria debido a la acción de exo y endonucleasas que provocan la degradación de una de las hebras del DNA. El DNA incorporado se aparea con la hebra complementaria de la región homóloga del DNA cromosómico y se produce un sobrecruzamiento recombinacional mediado por una proteína homónima a RecA de *E. coli* (Rhee y Morrison, 1988). El proceso de integración se completaría con la degradación nucleolítica del fragmento de la hebra cromosómica desplazada y por unión, mediante la DNA ligasa, de los extremos del DNA donador al DNA cromosómico. Este mecanismo fue propuesto por Lacks (1968) y permite la transferencia de nueva información genética del DNA donador en el cromosoma neumocócico. Según el modelo propuesto, en ninguna de las etapas de la transformación cromosómica intervendría un proceso de síntesis reparadora de DNA.

En este trabajo hemos construido dos estirpes de *S. pneumoniae* (MP541, MP551) que contienen una inserción del gen *cat* de pJS3 en distintas posiciones del gen *polA*. Estas estirpes expresan dos derivados de Spn PolI (PolIn620, PolIn351a) sin actividad polimerásica. Los niveles de transformación cromosómica con DNA neumocócico en estas estirpes se corresponden a un 20% de la estirpe silvestre. Este efecto es anulado por la presencia en la estirpe MP560 de dos genes *polA* mutantes, uno integrado ectopicamente en el locus *malm*, que codifica el derivado Spn PolIn351b, con actividad exonucleásica 5'→3' y otro, presente en el

locus *polA* que expresa el polipéptido Spn PolIc269, con actividad polimerásica. Estos resultados parecerían indicar una implicación de la actividad polimerásica en la transformación bacteriana. Sin embargo, el descenso en los niveles de transformación cromosómica de las estirpes MP541 y MP551, parece ser adscribible a la degradación del DNA donador monocatenario, catalizada por el dominio con actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI. Esta hipótesis se apoya en los reducidos niveles de transformación cromosómica detectados en la estirpe MP555. En esta estirpe además de la expresión de Spn PolI silvestre, existe un derivado (Spn PolIn351b) con actividad exonucleásica 5'→3'. Así mismo, en *E. coli* la presencia de DNAsas codificadas por los genes *dns* de *Vibrio cholerae* y *nuca* de *Anabaena* reducen la frecuencia de transferencia plasmídica (Focareta y Manning, 1991; Muro, 1992). La restauración de los niveles de transformación cromosómica en la estirpe MP560 sugiere algún tipo de interacción conjunta de los polipéptidos Spn PolIn351b y Spn PolIc269, que impediría la acción degradativa del polipéptido con actividad exonucleásica. Esta hipótesis es probable que sea cierta si se analizan los resultados de Setlow y Kornberg, (1972). Estos autores demostraron que los productos proteolíticos de Eco PolI actúan conjuntamente sobre el sustrato poli [d(A-T)] primado, simulando las características cinéticas de Eco PolI.

En este trabajo hemos analizado el requerimiento del dominio con actividad polimerásica de Spn PolI en el establecimiento de plásmidos vectores (pLS1 y pLS5), y plásmidos recombinantes (pSM22, pLS69, pLS83 y pLS86). Estos dos grupos plasmídicos se diferencian, respectivamente, en la ausencia o presencia de homología con el cromosoma neumocócico. Estos plásmidos se establecen en *S. pneumoniae* por dos mecanismos distintos (revisado en Lacks, 1983). Los primeros, mediante un proceso de transferencia plasmídica, en el que es necesaria la incorporación por la bacteria de dos hebras complementarias del DNA donador para regenerar una molécula íntegra de plásmido (Saunders y Guild, 1981; López y cols, 1982). Los segundos se establecen primordialmente por un mecanismo denominado de facilitación, en el que el establecimiento plasmídico solo requeriría la incorporación de una hélice de DNA y su posterior interacción con el cromosoma (López y cols, 1982; López y cols, 1984a).

En el modelo propuesto para el establecimiento de plásmidos sin homología con el cromosoma se requiere la acción de un enzima reparadora que restaure la integridad de las dos hebras complementarias del DNA, ya que en la entrada del DNA plasmídico al interior celular se producen roturas endonucleolíticas y exonucleolíticas que generan moléculas monocatenarias no íntegras. Estas hélices se aparearían por las zonas complementarias y generarían moléculas bicatenarias con regiones monocatenarias, que han de ser reparadas. Nuestros resultados atribuyen esta función al dominio con actividad polimerásica de Spn PolI. En las estirpes MP541 y MP551, deficientes en actividad polimerásica, los plásmidos pLS1 y pLS5 no son capaces de establecerse. Sin embargo, en la estirpe MP560 que posee dos derivados de Spn PolI, PolIn351b y PolIc269, con actividad exonucleásica 5'→3' y polimerásica, se alcanza una eficiencia de aproximadamente el 8% respecto al establecimiento de vectores en la estirpe silvestre. Este

descenso es probablemente debido a la reducción al 20% de la actividad polimerásica del derivado PolIc269 respecto a la proteína parental. En la estirpe MP555, que expresa Spn PolI silvestre y el derivado Spn PolIn351b se produce una ligera reducción, probablemente como consecuencia de la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolIn351b sobre el establecimiento del DNA plasmídico donador. Esta acción sería similar a la observada en la transformación cromosómica de esta estirpe.

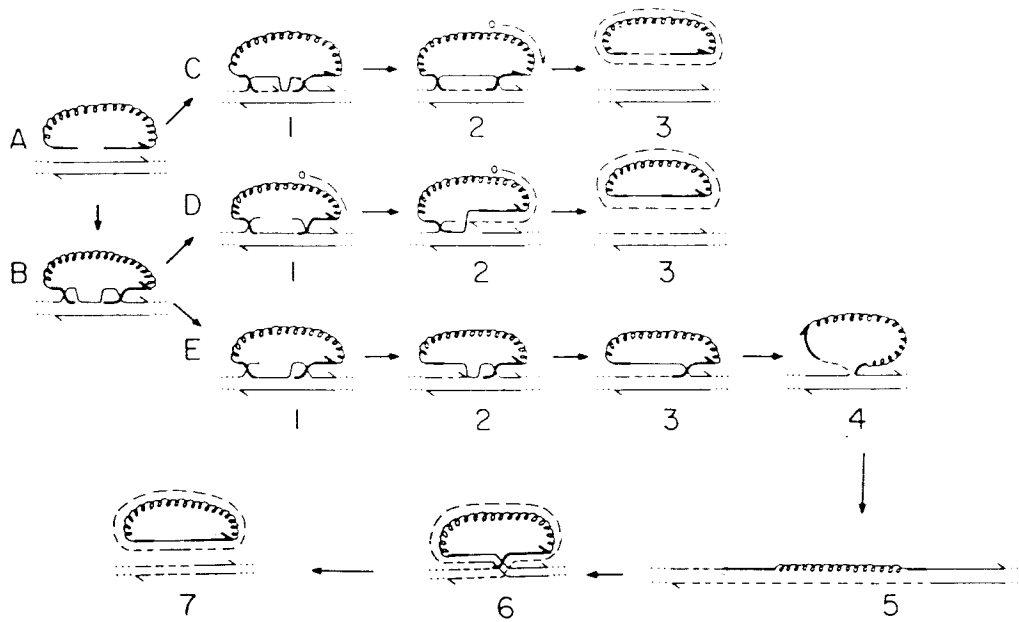
Se han propuesto tres mecanismos alternativos para explicar la interacción del DNA plasmídico con el cromosoma en el proceso de facilitación (López y cols, 1982). En la Fig. 49 se recogen esquemáticamente las etapas intermedias del proceso de facilitación de cada uno de los mecanismos sugeridos (Fig. 49C, D y E). En éstos el establecimiento plasmídico requeriría la incorporación de una sola hélice de DNA (Fig. 49A), que posteriormente interaccionaría con el cromosoma (Fig. 49B) y por la acción de un enzima reparador se regeneraría una hebra monocatenaria de DNA plasmídico, que sería replicada posteriormente, obteniéndose una molécula de DNA circular covalentemente cerrada.

Los plásmidos recombinantes se establecen en las estirpes mutantes (MP541 y MP551) con un 20% de eficiencia respecto a la estirpe silvestre. Esta reducción en los niveles de transformación son exclusivamente adscribibles a la ausencia de actividad polimerásica de Spn PolI, y no a la existencia de un polipéptido derivado de Spn PolI con actividad exonucleásica 5'→3', ya que la eficiencia de establecimiento del plásmido recombinante pLS86 en la estirpe MP555 es similar a la observada en la estirpe silvestre. Estos resultados reflejan una diferencia respecto al absoluto requerimiento del dominio polimerasa de Spn PolI en el establecimiento de plásmidos vectores, sugiriendo la presencia de otro enzima que sustituya a Spn PolI ó la existencia de otro mecanismo alternativo independiente de Spn PolI en el establecimiento de plásmidos recombinantes. La presencia del dominio polimerasa de Spn PolI en el derivado PolIc269 restaura parcialmente los niveles de transferencia del plásmido pLS86.

Para el establecimiento de plásmidos recombinantes por facilitación se han propuesto tres mecanismos (López y cols, 1982 y Fig. 49). En el primero de ellos (C) se requería la colaboración de un enzima reparador para constituir una molécula monocatenaria íntegra del plásmido. En el segundo (D) solo es necesario una polimerización regeneradora del cromosoma previa al establecimiento del plásmido. Por último, en el tercer mecanismo (E) se requiere una reparación cromosómica anterior a la integración del plásmido, que posteriormente es escindido del cromosoma. Nuestros resultados descartan que la facilitación transcurra por el segundo de los mecanismos (D), pero no nos permiten discernir C y E.

## **FUNCION DEL DOMINIO DE ACTIVIDAD POLIMERASICA DE SPN POLI EN LA REPLICACION DE PLASMIDOS DERIVADOS DE PLS1**

En este estudio se ha analizado por primera vez la función de una DNA Polimerasa tipo I en la replicación de plásmidos de bacterias Gram +, que replican según el modelo círculo



**Fig. 49. Mecanismos de facilitación que permiten el establecimiento de plásmidos recombinantes propuesto por López y cols, (1982).** Después de la entrada del fragmento de DNA plasmídico (A), se produce una sinápsis tipo "D-loop" (B). Estos autores proponen tres alternativas para el establecimiento del plásmido recombinante: (C) Mecanismo de elección de copia, 1, después de la sinápsis, se produce el relleno del "gap" en la hebra plasmídica; 2, síntesis de la hebra complementaria del plásmido a partir del origen (-); 3, establecimiento del plásmido recombinante bicatenario circular. (D) Mecanismo de donación cromosómico, 1, unión covalente del fragmento plasmídico a ambos extremos de la hebra de DNA cromosómico; 2, síntesis de la hebra complementaria plasmídica; 3, establecimiento del plásmido recombinante bicatenario circular, y reparación del cromosoma. (E) Integración y escisión del cromosoma, 1, unión covalente de uno de los extremos de la hebra plasmídica al cromosoma; 2, relleno replicativo del "gap"; 3, unión del DNA sintetizado al extremo libre del fragmento plasmídico; 4, integración del segmento plasmídico en el cromosoma; 5, conversión a DNA bicatenario mediante la replicación cromosómica; 6, recombinación homóloga; 7, establecimiento del plásmido recombinante bicatenario circular. Símbolos: línea ondulada, región perteneciente al vector; línea gruesa, segmento cromosómico clonado en el plásmido; línea delgada, segmento cromosómico homólogo; línea discontinua, segmento recién sintetizado; las flechas indican la polaridad y dirección de la replicación del DNA; (o) origen (-) de replicación.

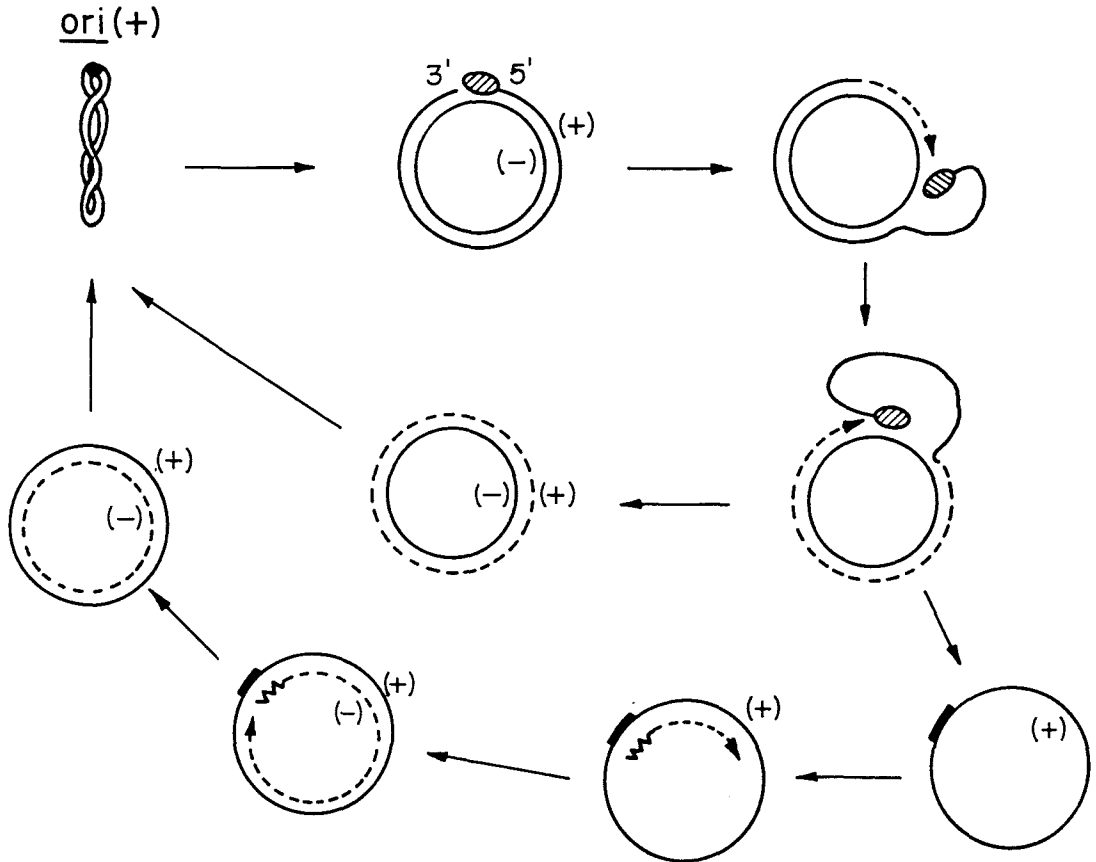
rodante asimétrico.

La replicación del plásmido pLS1 tiene lugar mediante el modelo de replicación de círculo rodante asimétrico (Fig. 50). El proceso se inicia cuando la proteína RepB introduce una rotura específica de la cadena (+) en la región del origen, generando un extremo 3'-OH libre, quedando probablemente la proteína unida covalentemente al extremo 5'-P. La síntesis de la cadena líder tendría lugar por extensión del extremo 3'-OH, mientras la hebra (+) parental va siendo desplazada. Cuando la horquilla de replicación alcanza el ori (+) regenerado, terminaría la síntesis de la cadena líder y se produciría, al mismo tiempo, la circularización y liberación de la hebra desplazada. Esta presentaría una señal reconocida por las proteínas del huésped para la iniciación de la cadena retrasada, con cuya síntesis concluiría la replicación semiconservativa del DNA plasmídico (del Solar, 1991).

En este trabajo hemos analizado la replicación del plásmido pLS86 en los mutantes *polA*, que codifican polipéptidos derivados de Spn PolI sin actividad polimerásica. Nuestros resultados indican que la replicación de pLS86 requiere la actividad polimerásica de Spn PolI, ya que el plásmido pLS86 presenta inestabilidad segregacional en las estirpes *polA*' (MP541 y MP551), el plásmido se pierde transcurridas varias generaciones de crecimiento en un medio de cultivo sin presión selectiva (Tc). En la estirpe MP560, la presencia del derivado Spn PolIc269, que posee un 20% de actividad polimerásica respecto a la proteína silvestre, permite el establecimiento del plásmido durante al menos 50 generaciones, confirmándose la implicación de Spn PolI en la replicación del plásmido pLS1.

En el análisis comparativo de las formas intermediarias de replicación de las distintas estirpes, detectamos un incremento en la forma monocatenaria del plásmido pLS86 en las estirpes deficientes *polA*. En MP551 se acumula más cantidad de ssDNA que la estirpe MP541, y probablemente este dato repercute en la mayor inestabilidad segregacional del plásmido pLS86 en la estirpe MP551. Posteriormente se estudiaron las formas bicatenarias e intermediarias de replicación que presentan discontinuidades específicas, mediante digestión del DNA plasmídico con el enzima *EcoRI*. Además del fragmento de DNA mayoritario de 4,4 kb, se detectaron 4 fragmentos. La presencia de éstos puede ser explicada teniendo en cuenta las etapas de la replicación de pLS1. La proteína RepB codificada por el plásmido pLS1 inicia la replicación mediante una incisión monocatenaria en la hebra (+) en la posición 2725, entre los residuos G/A (de la Campa y cols, 1990). Esta molécula de DNA al ser digerida con *EcoRI* generaría dos fragmentos de 2725 y 1736 pb (Fig. 51), que hibridarían con la sonda pLS1. Estos dos fragmentos coincidirían con las bandas de 2,7 y 1,7 kb detectadas en el gel alcalino, y se generarían por la digestión con *EcoRI* de una molécula de pLS1 que ha sufrido la rotura específica por RepB, pero que aún no ha iniciado la replicación de su hebra líder. Otro posible intermediario de la replicación de pLS1, que presentaría una discontinuidad surge de la replicación de la hebra retrasada del plásmido, en la conversión de la monocadena a bicadena. Se conocen muy pocos datos sobre esta etapa de la replicación de pLS1 (del Solar y cols, 1987),



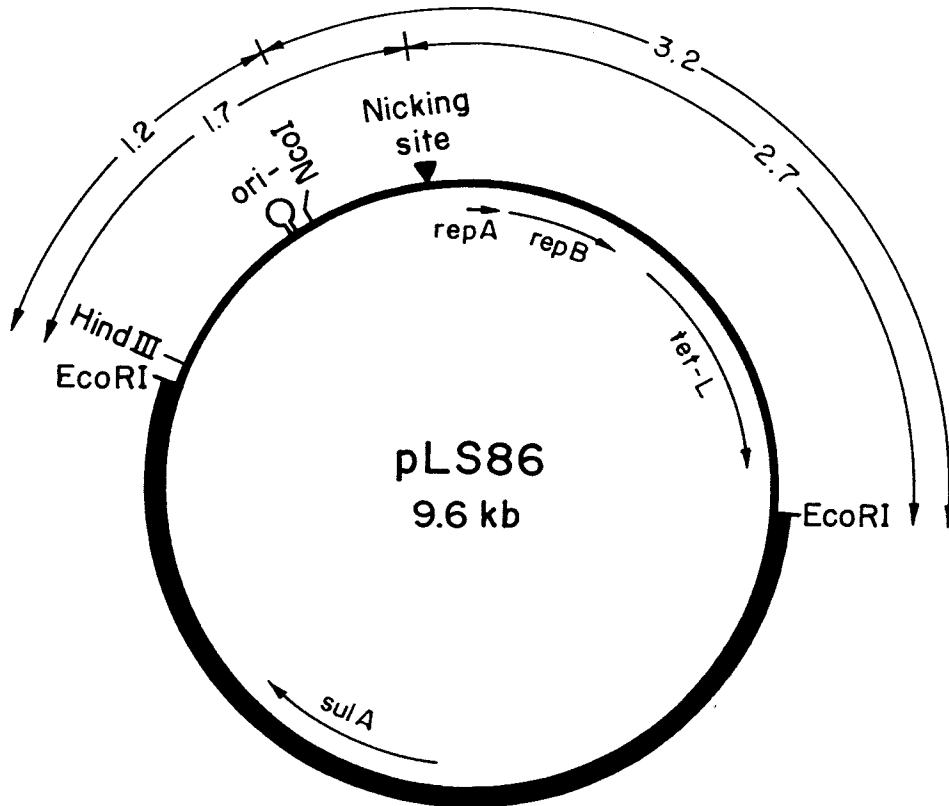


**Fig. 50.** Esquema de la replicación mediante círculo rodante asimétrico. Se indican las etapas del proceso replicativo que conllevan a la producción de dos moléculas de plásmido por cada unidad. La síntesis se inicia por la incisión de la proteína RepB ( ) en el origen (+). El extremo 3'-OH generado es utilizado como "primer" por los enzimas replicativos de la célula huésped, produciéndose finalmente la liberación de una molécula de plásmido circular bicatenario y una hebra monocatenaria circular. Esta presenta una señal reconocida por enzimas del huésped (ori -), que sintetizan un RNA "primer" (^^^) utilizado como cebador de la síntesis de DNA. Al término de la replicación es eliminado el RNA "primer", rellenado el "gap" resultante y sellado el "nick" de la molécula bicatenaria. En la replicación de la hebra retrasada se produce la conversión de la forma de DNA monocatenaria a bicatenaria. La línea discontinua indica DNA recién sintetizado.

unicamente se ha delimitado el origen de replicación, ori (-), en un fragmento *HindIII*(4299)-*NcoI*(3357). Este origen estaría situado en una posible estructura secundaria tipo tallo-lazo, que localizaría el centro del lazo en el nucleótido 3423. A partir de este origen y mediante enzimas del huésped, se completaría la replicación de la hebra retrasada. En la última etapa y teniendo en cuenta la similitud de replicación del replicón pLS1 y los fagos de cadena sencilla de *E. coli* (revisado en Baas, 1985), es posible prever la función de PolI de *S. pneumoniae* en la conversión de la forma monocatenaria a bicadena. Se requeriría la actividad exonucleásica de PolI que eliminaría el RNA cebador a partir del cual se inició la replicación, y su actividad polimerásica rellenaría la discontinuidad generada (Chen y Ray, 1976; Dasgupta y Mitra, 1978). Los fragmentos detectados en el gel alcalino de 3,2 y 1,2 kb podrían generarse a partir de la digestión con *EcoRI* de estas moléculas, en las que existe una discontinuidad debida a la ausencia de la actividad polimerásica de PolI. Esta actividad puede ser parcialmente sustituida por otra polimerasa, puesto que la mayor parte de las moléculas plasmídicas completan la replicación.

Nuestros resultados sitúan el final de la elongación del RNA cebador en la replicación de la hebra retrasada de pLS1, aproximadamente sobre el nucleótido 3200 (Fig. 51). Esta posición no estaría entre los límites postulados por del Solar y cols, (1987) en el fragmento *HindIII*(4299)-*NcoI*(3357). La replicación de la hebra retrasada transcurre en dirección *NcoI*→*HindIII*, de manera que al situar el final de la replicación delante de *NcoI* estamos trasladando a su vez la síntesis del RNA cebador fuera del fragmento indicado. Estos resultados sugieren que en el fragmento *HindIII*-*NcoI* se sitúa el elemento reconocido por el enzima que sintetiza el RNA, pero la reacción de polimerización se realiza a una cierta distancia del lugar de reconocimiento del enzima. En la replicación *in vitro* de la forma monocatenaria del plásmido pT181 (que replica según el modelo de círculo rodante asimétrico) se ha intentado identificar el sitio exacto de la iniciación (Birch y Khan, 1992). Sin embargo, no ha sido posible, sugiriendo estos autores la posibilidad de múltiples iniciaciones en una región próxima al origen de la cadena retrasada.

La acumulación de la forma monocatenaria de pLS86 y la detección de los fragmentos de 2,7 y 1,7 kb en las estirpes deficientes en la actividad polimerásica, indican un bloqueo en la iniciación de la replicación de las hebras líder y retrasada. Esta interferencia podría relacionarse directamente con la ausencia de la actividad polimerásica de PolI. Se podría requerir la actividad polimerásica de PolI, asociada o no a su actividad exonucleásica 5'→3', para procesar o elongar el DNA o RNA cebador en la etapa inicial de la replicación. Esta función de Spn PolI podría asemejarse al papel de Eco PolI en la replicación del plásmido ColE1 (Grindley y Kelley, 1976; Suiba y Kogoma, 1986), sin embargo teniendo en cuenta los datos de la replicación de fagos de *E. coli* de cadena sencilla y de los plásmidos de bacterias Gram + (pT181 y pUB110), que replican siguiendo el modelo de círculo rodante, es probable que no se requiera Spn PolI en las etapas iniciales de la replicación de las dos hebras de pLS1:



**Fig. 51. Mapa físico de pLS86.** Símbolos genéticos: *repA* y *repB*, codifican proteínas implicadas en la replicación del plásmido, *tet-L* y *sulA* codifican proteínas que confieren resistencia a Tc y a Sulfanilamidas. Las flechas indican la dirección de transcripción de estos genes. Se indican únicamente los sitios de restricción *EcoRI* del plásmido y los sitios *NcoI* y *HindIII* próximos a la estructura *ori* (-) del plásmido pLS86. Símbolos: triángulo negro invertido, sitio de incisión de la proteína de replicación RepB; estructura tallo-lazo, región implicada en la conversión de monocadena a bicadena en la replicación mediante círculo rodante asimétrico; línea fina, inserto del cromosoma de *S. pneumoniae*; línea gruesa, vector pLS1. Se indican los tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos, a partir de las formas intermedias de replicación de pLS86 digeridas con *EcoRI*.

a) La replicación de la hebra líder comienza con la rotura monocatenaria de la proteína de replicación en un lugar específico de secuencia. Se ha postulado que la actividad helicasa de las proteínas de replicación de los plásmido pT181 y pUB110, generarían un espacio libre adyacente al extremo 3'-OH que permite la entrada del holoenzima PolIII (Noirot y cols, 1990). Sin embargo, Iordanescu y Basheer (1991) postulan que la entrada del complejo multiproteico está mediada por un enzima con actividad helicasa independiente de la proteína de replicación. Se ha observado la acumulación de formas circulares abiertas del plásmido pT181, correspondientes al complejo de iniciación, en una estirpe de *B. subtilis pcrA3*. Esta mutación se ha adscrito a una proteína que presenta homología con la helicasa II de *E. coli* y la proteína Rep requerida en la replicación del bacteriofago  $\phi$ X174. A continuación, el holoenzima PolIII elongaría el extremo 3'-OH generado por la proteína de replicación, utilizando como molde la hebra (+) del plásmido. Se ha demostrado que la replicación *in vivo* del plásmido pT181 es inhibida por la adición de 5-hidroxifenil azouracilo, inhibidor de PolIII (Majumder y Novick, 1988). Además la replicación de la hebra líder en pUB110 es bloqueada a temperatura no permisiva en mutantes *dnaD*, *dnaF*, *dnaH* y *dnaN*, que codifican varias subunidades del holoenzima PolIII de *B. subtilis* (Alonso y cols, 1988). La última etapa de la replicación requiere la circularización de la hebra recién replicada por la acción de la proteína de replicación.

b) La replicación de la hebra retrasada se inicia con la síntesis de un RNA. Este puede ser polimerizado por distintas enzimas, RNA polimerasa, primasa ó primosoma, dependiendo en cada caso de la identidad del fago o plásmido que replique. A continuación de nuevo el holoenzima PolIII copiaría casi íntegramente el molde, generando una molécula bicatenaria con una discontinuidad, que sería eliminada por la acción de PolI y ligasa (revisado en Baas, 1985; Birch y Khan, 1992).

En base a nuestros resultados y a los datos que se conocen de la replicación de plásmidos Gram + y colifagos de *E. coli* postulamos el requerimiento del dominio polimerasa Spn PolI en la replicación del plásmido pLS1, y más concretamente en la última etapa de la conversión de la monocadena a bicadena. Así mismo sugerimos que el holoenzima PolIII iniciaría la replicación de las hebras líder y retrasada de pLS1. A su vez, este complejo proteico o alguno de sus ensamblajes probablemente sustituirían en los mutantes *polA* al dominio polimerasa de Spn PolI, en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki durante la replicación cromosómica, este hecho supondría una elevada utilización de PolIII, produciéndose una descoordinación entre las iniciaciones de la replicación de las dos hebras del plásmido pLS1 y la posterior elongación por PolIII, aumentando la vida media de las moléculas que contienen un "nick" en el origen (+) y las formas monocatenarias que no han iniciado la síntesis de la cadena retrasada, permitiendo su detección en los extractos de DNA. La acumulación de dichas formas provocaría una disminución del número de copias de plásmido y después de varias generaciones en un medio de cultivo sin presión selectiva se produciría la pérdida del plásmido.

## FUNCION DE SPN POLI EN REPARACION DE DAÑOS DEL DNA EN *S. PNEUMONIAE* Y *E. COLI*

Hemos analizado la capacidad de reparación de daños en el DNA, de distintas estirpes silvestres (R61, MP555) y mutantes *polA* (MP558, MP560) de *S. pneumoniae*. Además de estudiar el nivel de complementación de Spn PolI o sus derivados (PolIc269, PolIn351a) en mutantes *polA* de *E. coli*.

En *S. pneumoniae* no existe un sistema de reparación inducible por daños en el DNA, dependiente de *recA* y *lexA*, similar al de *E. coli* y *B. subtilis*. También carece de una vía de reparación mediada por luz (fotoreactivación), presente en las otras bacterias. *S. pneumoniae* posee un sistema de reparación a daños en el DNA menos eficiente que *E. coli*. En similares condiciones de irradiación la estirpe silvestre de *S. pneumoniae* presenta una mortandad celular similar a la del mutante *lexA1* de *E. coli* (Gasc y cols, 1980) y muestra menor supervivencia que la estirpe silvestre de *E. coli*. Se han aislado en *S. pneumoniae* algunas mutaciones que aumentan la sensibilidad celular a la irradiación UV (Lacks, 1970; Sicard y Estevenon, 1990) y están localizadas en un gen homólogo a *uvrB* de *E. coli* (Sicard y cols, 1992). Experimentos de complementación en mutantes *uvrB* de *E. coli* con el gen *uvrB* neumocócico han fracasado hasta el momento. Es probable que algunos de los genes implicados en reparación de lesiones de DNA en *E. coli*, estén presentes en *S. pneumoniae* [*polA*, *uvrB*, *exoA* (Puyet y cols, 1989)] y actúen formando parte de sistemas de reparación diferentes a los de *E. coli*.

La estirpe *S. pneumoniae* MP558, que expresa un derivado de Spn PolI sin actividad polimerasa, presenta una mayor mortandad celular al ser irradiada con luz UV que la estirpe silvestre. Este resultado sugiere un papel similar de los dominios polimerasa de Spn PolI y Eco PolI en la reparación de daños en el DNA, mediante la vía de reparación por escisión (Cooper, 1977; Caron y cols, 1985). En este tipo de reparación en *E. coli*, después de la eliminación de un fragmento de 12 ó 13 nt (que contiene la lesión) por el complejo UvrABC interviene Eco PolI. Su función es casi exclusivamente la síntesis reparadora del DNA dañado, ya que la eliminación del dominio exonucleásico solo conlleva un ligero incremento en la sensibilidad a luz UV, mientras que la carencia del dominio polimerizante de Eco PolI en los cultivos tratados con UV provoca un aumento elevado de la mortandad celular (Cooper, 1977; Wahl y cols, 1983). La presencia de Spn PolIc269 en la estirpe *S. pneumoniae* MP560 produce una situación intermedia en la supervivencia celular de cultivos tratados con luz UV, respecto a la estirpe silvestre y MP558, produciéndose una complementación parcial de la mutación a baja dosis de energía.

Las estirpes *polA5* y *polA480ex* de *E. coli* codifican polipéptidos con una mutación puntual, que disminuye la procesividad de la polimerasa y anulan prácticamente la actividad exonucleásica 5'→3' en ensayos *in vitro*, respectivamente (Matson y cols, 1978; Konrad y Lehman, 1974). En estas estirpes mutantes el enzima Spn PolI codificado por el plásmido

multicopia pSM31, complementa totalmente los defectos en reparación de DNA. El derivado Spn PolIc269 codificado por el plásmido pSM45 en la estirpe *polA5* permite una recuperación parcial en la viabilidad de la estirpe mutante, sin embargo Spn PolIn351a no ejerce ningún efecto en la estirpe *polA480ex*. Se pueden plantear varias hipótesis alternativas para interpretar este resultado negativo:

1) El derivado neumocócico PolIn351a pudiera no ser funcional en *E. coli*. Esta posibilidad es poco probable ya que este polipéptido garantiza la supervivencia en *S. pneumoniae*.

2) La ineficacia en la complementación del derivado Spn PolIn351a en la estirpe *polA480ex* podría ser consecuencia de la alteración íntegra del enzima Eco PolII, comportándose como un mutante nulo. Esta hipótesis está apoyada por los resultados mostrados por Joyce y Grindley, (1984). Estos autores detectaron que la estirpe *polA480ex* se comporta a temperatura no permisiva como un mutante letal condicional. En estas condiciones la mutación *polA480ex* repercute en la actividad exonucleásica 5'→3' y polimerásica. Sin embargo, Konrad y Lehman, (1974) en ensayos *in vitro* solo detectaron una elevada disminución en la actividad exonucleásica 5'→3' del enzima mutante; Cooper, (1977) analizó la supervivencia a la luz UV de esta estirpe, en condiciones de crecimiento permisivas y no permisivas, no observando diferencias en la viabilidad celular en respuesta a la temperatura. Estos resultados contradictorios probablemente derivan de una función distinta de PolII en la replicación cromosómica y en la reparación de daños en el DNA en *E. coli*.

3) El derivado Spn PolIn351, con actividad exonucleásica 5'→3', no podría interactuar adecuadamente con el enzima mutante Eco PolII y no corregiría los defectos en polimerización de este enzima. Wahl y cols, (1983) mostraron que los niveles de reparación de DNA de la estirpe mutante *polA480ex* son similares a los de una estirpe que exprese solamente el fragmento Klenow, y los defectos en reparación son debidos principalmente a polimerizaciones incompletas en las discontinuidades del DNA y a desplazamientos de hebra en el molde, estos sustratos no son utilizables por la DNA ligasa. La ineficiente reacción de polimerización sería consecuencia de la ausencia de la actividad exonucleasa 5'→3' de Eco PolII en la estirpe mutante.

Nuestros resultados contradicen la segunda alternativa, ya que la estirpe *polA480ex* tratada con luz UV presenta un nivel de supervivencia intermedio entre la estirpe silvestre y la deficiente en actividad polimerásica, no comportándose como un mutante  $\Delta polA$ , que carecería de ambas actividades, y no podría ser complementado por ninguno de los dominios enzimáticos independientes de Spn PolII. Nosotros proponemos que el dominio exonucleasa del enzima mutante, codificado por *polA480ex*, compite por el sustrato con el derivado neumocócico PolIn351a e impide la complementación. Sin embargo en la competición entre la proteína mutante de *E. coli* y Spn PolII, este polipéptido íntegro poseería una mayor ventaja en la interacción con el sustrato, que permitiría una reparación eficaz de los daños del DNA. La complementación positiva de Spn PolII en ambos mutantes y Spn PolIc269 en el mutante *polA5*,

---

revela una perfecta interacción de Spn PolI y del dominio polimerizante en el sistema de reparación por escisión, mediado por el complejo enzimático UvrABC. Esto podría revelar parte del potencial de Spn PolI en una vía de reparación de daños en el DNA en un sistema bacteriano heterólogo.

## **CONCLUSIONES**



- 1.- La identificación del inicio del RNA transcrito del gen *polA* y la determinación de la secuencia del extremo amino terminal de la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* revela una situación poco común entre los genes procarióticos. El RNA transcrito del gen *polA* comienza tan solo 2 nt antes del codon de iniciación para la traducción de Spn PolI, y por lo tanto carece de una secuencia SD típica.
- 2.- Las señales de iniciación y terminación de la transcripción del gen *polA* son reconocidas en los tres sistemas bacterianos analizados, *S. pneumoniae*, *E. coli* y *B. subtilis*.
- 3.- El enzima Spn PolI pertenece a la familia A de las DNA polimerasas.
- 4.- La DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* posee dos actividades enzimáticas: exonucleásica 5'→3' y polimerásica, situadas en los extremos amino y carboxilo terminal del polipéptido. Carece de un dominio intermedio con actividad exonucleásica 3'→5', aunque conserva parcialmente las regiones Exo I, II y III que caracterizan a esta actividad enzimática.
- 5.- Los productos generados por la actividad exonucleásica 5'→3' son de una talla similar a los producidos por las otras polimerasas bacterianas. La única diferencia estriba en la proporción relativa de cada uno de ellos. El sustrato de menor talla no atacable por la actividad exonucleásica 5'→3' es un oligonucleótido de 10-mer.
- 6.- El extremo 5' del gen *polA*, que codifica la actividad exonucleásica 5'→3' de Spn PolI, es esencial para la supervivencia celular de *S. pneumoniae*.
- 7.- La actividad polimerásica de Spn PolI está implicada en los procesos de transformación cromosómica y establecimiento plasmídico en *S. pneumoniae*.
- 8.- La actividad polimerásica de Spn PolI es requerida en la replicación de los plásmidos basados en el replicón pLS1.
- 9.- La actividad polimerásica de Spn PolI participa en la reparación de daños en el DNA, de células de *S. pneumoniae* tratadas con luz UV. El enzima Spn PolI complementa las mutaciones en los dominios exonucleásico 5'→3' y polimerásico de Eco PolI en la vía de reparación por escisión de lesiones generadas por irradiación con luz ultravioleta.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 
- Abramson, R.D., Holland, P.M., Watson, R. and Gelfand, D.H. (1992). Characterization of the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *J. Cell. Biochem.*, **16B**, p.23.
- Aiba, H., Adhya, S. and de Crombrughe, B. (1981). Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.*, **256**, 11905-11910.
- Alonso, J.C., Stiege, C.A., Tailor, R.H. and Viret, J-F. (1988). Functional analysis of the *dna(ts)* mutants of *Bacillus subtilis*: plasmid pUB110 replication as a model system. *Mol. Gen. Genet.*, **214**, 482-489.
- Argos, P. (1988). A sequence motif in many polymerases. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 9909-9916.
- Baas, P.D. (1985). DNA replication of single-stranded *Escherichia coli* DNA phages. *Biochim. Biophys. Acta*, **825**, 111-139.
- Balakin, A.G., Skripkin, E.A., Shatsky, I.N. and Bogdanov, A.A. (1992). Unusual ribosome binding properties of mRNA encoding bacteriophage  $\lambda$  repressor. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 563-571.
- Ballester, S., López, P., Alonso, J.C., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1986). Selective advantage of deletions enhancing chloramphenicol acetyltransferase gene expression in *Streptococcus pneumoniae* plasmids. *Gene*, **41**, 153-163.
- Ballester, S., Alonso, J.C., López, P. and Espinosa, M. (1990). Comparative expression of the pC194 *cat* gene in *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene*, **86**, 71-79.
- Barnes, M.H., Hammond, R.A., Kennedy, C.C., Mack, S.L. and Brown, N.C. (1992). Localization of the exonuclease and polymerase domains of *Bacillus subtilis* DNA polymerase III. *Gene*, **111**, 43-49.
- Basu, S., Basu, A. and Modak, M.J. (1988). Pyridoxal 5'-phosphate mediated inactivation of *Escherichia coli* DNA polymerase I: identification of Lys-635 as an essential residue for the processive mode of DNA synthesis. *Biochemistry*, **27**, 6710-6716.
- Basu, A. and Modak, M.J. (1987). Identification and amino acid sequence of the deoxynucleoside triphosphate binding site in *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Biochemistry*, **26**,

1704-1709.

- Beese, L.S., Derbyshire, V., Cowart, M., Friedman, J.M. and Steitz, T.A. (1992). Cocystal structure of the Klenow fragment of DNA polymerase I from *E. coli* and duplex DNA. *J. Cell. Biochem.*, **16B**, p.24.
- Beese, L.S. and Steitz, T.A. (1991). Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.*, **10**, 25-33.
- Berk, A.J. and Sharp, P.A. (1977). Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids. *Cell*, **12**, 721-732.
- Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J.M., Martín, G. and Salas, M. (1989). A conserved 3'→5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*, **59**, 219-228.
- Bernad, A., Blanco, L. and Salas, M. (1990). Site-directed mutagenesis of the YCDTDS amino acid motif of the  $\phi$ 29 polymerase. *Gene*, **94**, 45-51.
- Bernad, A., Zaballos, A., Salas, M. and Blanco, L. (1987). Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *EMBO J.*, **6**, 42219-4225.
- Birnboim, H.C. and Doly, S. (1979). A rapid alkalyne extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1528.
- Birch, P. and Khan, S.A. (1992). Replication of single-stranded plasmid pT181 DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 290-294.
- Blanco, L., Bernad, A., Blasco, M.A. and Salas, M. (1991a). A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. *Gene*, **100**, 27-38.
- Blanco, L., Bernad, A. and Salas, M. (1991b). MIP1 DNA polymerase of *S. cerevisiae*: structural similarity with the *Escherichia coli* DNA polymerase I-type enzymes. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 955.
- Blanco, L., Bernad, A. and Salas, M. (1992). Evidence favouring the hypothesis of a conserved 3'-5' exonuclease active site in DNA-dependent DNA polymerases. *Gene*, **112**, 139-144.

- 
- Blow, J. (1989). Eukaryotic chromosome replication requires both  $\alpha$  and  $\delta$  DNA polymerases. *TIG*, **5**, 134-136.
- Bonner, C.A., Hays, S., McEntee, K. and Goodman, M.F. (1990). DNA polII is encoded by the DNA damage-inducible *dinA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7663-7667.
- Bonner, C.A., Stukenberg, P.T., Rajagopalan, M., Eritja, R., O'Donnell, M., McEntee, K., Echols, H. and Goodman, M.F. (1992). Processive DNA synthesis by DNA polymerase II mediated by DNA polymerase III accessory proteins. *J. Biol. Chem.*, **267**, 11431-11438.
- Brooke, R.G., Singhal, R., Hinkle, D.C. and Dumas, L.B. (1991). Purification and characterization of the 180- and 86-kilodalton subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA primase-DNA polymerase protein complex. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3005-3015.
- Brown, W.E., Stump, K.H. and Kelley, W.S. (1982). *Escherichia coli* DNA polymerase I. Sequence characterization and secondary structure predictions. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1965-1972.
- Brutlag, D., Atkinson, M.R., Setlow, P. and Kornberg, A. (1969). An active fragment of DNA polymerase produced by proteolytic cleavage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 982-989.
- Bryan, S.K. and Moses, R.E. (1988). Sufficiency of the Klenow fragment for survival of *polC(ts) pcbA1 Escherichia coli* at 43°C. *J. Bacteriol.*, **170**, 456-458.
- Burgers, P.M.J., Bambara, R.A., Campbell, J.L., Chang, L.M.S., Downey, K.M., Hübscher, U., Lee, M.Y.W.T., Linn, S.M. and So, A.G. (1990). Revised nomenclature for eukaryotic DNA polymerases. *Eur. J. Biochem.*, **191**, 617-618.
- Caron, P.R., Kushner, S.R. and Grossman, L. (1985). Involvement of helicase II (*uvrD* gene product) and DNA polymerase I in excision mediated by the *uvrABC* protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4925-4929.
- Catalano, C.E., Allen, D.J. and Benkovic, S.J. (1990). Interaction of *Escherichia coli* DNA polymerase I with azidoDNA and fluorescent DNA probes: identification of protein-DNA contacts. *Biochemistry*, **29**, 3612-3621.

- 
- Cavaliere, L.F., Modak, M.J. and Marcus, S.L. (1974). Evidence for allostery in *in vitro* DNA synthesis on RNA templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 858-862.
- Chen, J. and Morrison, D.A. (1988). Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, **64**, 155-164.
- Chen, T.-C. and Ray, D.S. (1976). M13 replication in a mutant of *Escherichia coli* defective in the 5'→3' exonuclease associated with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, **106**, 589-604.
- Chen, E.J. and Seeburg, P.H. (1985). Supercoil sequencing: a fast simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA*, **4**, 165-170.
- Chen, H., Sun, Y., Stark, T., Beattie, W. and Moses, R.E. (1990). Nucleotide sequence and deletion analysis of the *polB* gene of *Escherichia coli*. *DNA and Cell Biol.*, **9**, 631-635.
- Christie, G.E. and Calendar, R. (1985). Bacteriophage P2 late promoters II. Comparison of the four late promoter sequences. *J. Mol. Biol.*, **181**, 373-382.
- Contente, S. and Dubnau, D. (1979). Marker rescue transformation by linear plasmid DNA in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*, **2**, 555-571.
- Cooper, P. (1977). Excision-repair in mutants of *Escherichia coli* deficient in DNA polymerase I and/or its associated 5'→3' exonuclease. *Mol. Gen. Genet.*, **150**, 1-12.
- Cotterill, S.M., Reyland, M.E., Loeb, L.A. and Lehman, I.R. (1987). A cryptic proofreading 3'→5' exonuclease associated with the polymerase subunit of the DNA polymerase-primase from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5635-5639.
- Cozzarelli, N.R., Kelly, R.B. and Kornberg, A. (1969). Enzymatic synthesis of DNA. XXXIII Hydrolysis of a 5'-triphosphate-terminated polynucleotide in the active center of DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **45**, 513-531.
- Currier, T.C. and Nester, E.W. (1976). Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.*, **76**, 431-441.

- 
- d'Aubenton-Carafa, Y., Brody, E. and Thermes, C. (1990). Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminator. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J. Mol. Biol.*, **216**, 835-858.
- Dasgupta, S. and Mitra, S. (1978). Structure of nascent replicative form DNA of coliphage M13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 153-157.
- de la Campa, A., del Solar, G. and Espinosa, M. (1990). Initiation of replication of plasmid pLS1. The initiator protein RepB acts on two distant DNA regions. *J. Mol. Biol.*, **213**, 247-262.
- de la Campa, A.G., Kale, P., Springhorn, S.S. and Lacks, S.A. (1987). Proteins encoded by DpnII restriction gene cassette. Two methylases and an endonuclease. *J. Mol. Biol.*, **196**, 457-469.
- del Solar, G. (1991). Replicación del plásmido de amplio espectro de huesped pLS1. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- del Solar, G.H., Puyet, A. and Espinosa, M. (1987). Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the streptococcal plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 5561-5580.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. and Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering*, **3**, 461-467.
- Derbyshire, V., Freemont, P.S., Sanderson, M.R., Beese, L., Friedman, J.M., Joyce, C.M. and Steitz, T.A. (1988). Genetic and crystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I. *Science*, **240**, 199-201.
- Derbyshire, V., Grindley, N.D.F. and Joyce, C.M. (1991). The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction. *EMBO J.*, **10**, 17-24.
- Deutscher, M. and Kornberg, A. (1969). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXIX Hydrolysis of deoxyribonucleic acid from the 5' terminus by an exonuclease function of deoxyribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3029-3037.
- Dreyfus, M. (1988). What constitutes the signal for the initiation of protein synthesis on

- 
- Escherichia coli* mRNAs?. J. Mol. Biol., **204**, 79-94.
- Elie, C., De Recondo, A.M. and Forterre, P. (1989). Thermostable DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Purification, characterization and immunological properties. Eur. J. Biochem., **178**, 619-626.
- Englund, P.T., Kelly, R.B. and Kornberg, A. (1969). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXI Binding of deoxyribonucleic acid to deoxyribonucleic acid polymerase. J. Biol. Chem., **244**, 3045-3052.
- Focareta, T. and Manning, P.A. (1991). Distinguishing between the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and development of a transformation system. Mol. Microbiol., **5**, 2547-2555.
- Foury, F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene *mip1* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. J. Biol. Chem., **264**, 20552-20560.
- Freemont, P.S., Friedman, J.M., Beese, L.S., Sanderson, M.R. and Steitz, T.A. (1988). Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 8924-8928.
- Freemont, P.S., Ollis, D.L., Steitz, T.A. and Joyce, C.M. (1986). A domain of the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I has polymerase but no exonuclease activity. Proteins: Structure, function and genetics, **1**, 66-73.
- Gass, K.B. and Cozzarelli, N.R. (1973). Further genetic and enzymological characterization of the three *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid polymerases. J. Biol. Chem., **248**, 7688-7700.
- Gass, A.M., Sicard, N., Claverys, J.P. and Sicard, A.M. (1980). Lacks of SOS repair in *Streptococcus pneumoniae*. Mutation Res., **70**, 157-165.
- Gilson, E., Perrin, D. and Hofnung, M. (1990). DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *Escherichia coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. Nucl. Acids Res., **18**, 3941-3952.
- Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B.S. and Stormo, G. (1981). Translational initiation in prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol., **35**, 365-403.



- 
- Grindley, N.D.F. and Kelley, W.S. (1976). Effects of different alleles of the *Escherichia coli* K12 *polA* gene on the replication of non-transferring plasmids. *Mol. Gen. Genet.*, **143**, 311-318.
- Hamatake, R.K., Hasegawa, H., Clark, A.B., Bebenek, K., Kunkel, T.A. and Sugino, A. (1990). Purification and characterization of the DNA polymerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the catalytic core and a possible holoenzyme from of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4072-4083.
- Hamal, A., Forterre, P. and Elie, C. (1990). Purification and characterization of a DNA polymerase from the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 517-521.
- Hanahan, D. (1983). Studies on tranformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Han, H., Rifkind, J.M. and Mildvan, A.S. (1991). Role of divalent cations in the 3',5'-exonuclease reaction of DNA polymerase I. *Biochemistry*, **30**, 11104-11108.
- Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1982). Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.*, **150**, 815-825.
- Hsi, K-L., Copeland, W.C. and Wang, T.S-F. (1990). Human DNA polymerase  $\alpha$  catalytic polypeptide binds ConA and RCA and contains a specific labile site in the N-terminus. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6231-6237.
- Huber, H.E., Tabor, S. and Richardson, C.C. (1987). *Escherichia coli* thioredoxin stabilizes complexes of bacteriophage T7 DNA polymerase and primed templates. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16224-16232.
- Huberman, J.A. and Kornberg, A. (1970). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXV A 3'-hydroxylribonuclotide binding site of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 5326-5334.
- Hübscher, U. and Thömmes, P. (1992). DNA polymerase  $\epsilon$ : in search of a function. *TIBS*, **17**, 55-58.

- 
- Insdorf, N.F. and Bogenhagen, D.F. (1989). DNA polymerase  $\gamma$  from *Xenopus laevis*. II A 3'→5' exonuclease is tightly associated with the DNA polymerase activity. *J. Biol. Chem.*, **264**, 21498-21503.
- Iordanescu, S. and Basheer, R. (1991). The *Staphylococcus aureus* mutation *pcrA3* leads to the accumulation of pT181 replication initiation complexes. *J. Mol. Biol.*, **221**, 1183-1189.
- Ito, J. and Braithwaite, D.K. (1990). Yeast mitochondrial DNA polymerase is related to the family A DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6716.
- Ito, J. and Braithwaite, D.K. (1991). Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 4045-4057.
- Iwasaki, H., Ishino, Y., Toh, H., Nakata, A. and Shinagawa, H. (1991). *Escherichia coli* DNA polymerase II is homologous to  $\alpha$ -like DNA polymerases. *Mol. Gen. Genet.*, **226**, 24-33.
- Jones, T.A. (1978). A graphics model building and refinement system for macromolecules. *J. Appl. Crystallogr.* **11**, 268-272.
- Joyce, C.M. (1989). How DNA travels between the separate polymerase and 3'-5'-exonuclease sites of DNA polymerase I (Klenow fragment). *J. Biol. Chem.*, **264**, 10858-10866.
- Joyce, C.M. (1991). Can DNA polymerase I (Klenow fragment) serve as a model for other polymerases?. *Current Opinion in Structural Biol.*, **1**, 123-129.
- Joyce, C.M., Fujii, D.M., Laks, H.S., Hughes, C.M. and Grindley, N.D.F. (1985). Genetic mapping and DNA sequence analysis of mutations in the *polA* gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **186**, 283-293.
- Joyce, C.M. and Grindley, N.D.F. (1983). Construction of a plasmid that overproduces the large protolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1830-1834.
- Joyce, C.M. and Grindley, N.D.F. (1984). Method for determining whether a gene of *Escherichia coli* is essential: application to the *polA* gene. *J. Bacteriol.*, **158**, 636-643.

- 
- Joyce, C.M., Kelley, W.S. and Grindley, N.D.F. (1982). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli polA* gene and primary structure of DNA polymerase I. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1958-1964.
- Joyce, C.M., Ollis, D.L., Rush, J., Steitz, T.A., Konigsberg, W.H. and Grindley, N.D.F. (1986). Relating structure to function for DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Protein Structure Folding and Design*, 197-205.
- Kaguni, L.S. and Olson, M.W. (1989). Mismatch-specific 3'→5' exonuclease associated with the mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila embryos*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6469-6473.
- Kelley, W.S. and Joyce, C.M. (1983). Genetic characterization of early amber mutations in the *E. coli polA* gene and purification of the amber peptides. *J. Mol. Biol.*, **164**, 529-560.
- Kitani, T., Yoda, K., Ogawa, T. and Okazaki, T. (1985). Evidence that discontinuous DNA replication in *Escherichia coli* is primed by approximately 10 to 13 residues of RNA starting with a purine. *J. Mol. Biol.*, **184**, 45-52.
- Klenow, H. and Henningsen, I. (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 168-175.
- Kong, X-P., Onrust, R., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1992). Three-dimensional structure of the  $\beta$  subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell*, **69**, 425-437.
- Konrad, E.B. and Lehman, I.R. (1974). A conditional lethal mutant of *Escherichia coli* K12 defective in the 5'-3' exonuclease associated with DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2048-2051.
- Kornberg, A. (1980). *DNA replication*. Freeman, W.H. and Co. N.Y.
- Kornberg, A. and Baker, T.A. (1992). *DNA replication*. Freeman, W.H. and Co. N.Y.
- Kornberg, A., Lehman, I.R., Bessman, M. and Simms, E. (1956). Enzymes synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 197-198.

- 
- Kumar, A., Abbotts, J., Karawya, E.M. and Wilson, S.H. (1990a). Identification and properties of the catalytic domain of mammalian DNA polymerase  $\beta$ . *Biochemistry*, **29**, 7156-7159.
- Kumar, A., Widen, S.G., Williams, K.R., Kedas, P., Karper, R.L. and Wilson, S.H. (1990b). Studies of the domain structure of mammalian DNA polymerase  $\beta$ . Identification of a discrete template binding domain. *J. Biol. Chem.*, **265**, 2124-2131.
- Kunkel, T.A. (1988). Exonucleolytic proofreading. *Cell*, **53**, 837-840.
- Kunkel, T.A., Sabatino, R.D. and Bambara, R.A. (1987). Exonucleolytic proofreading by calf thymus DNA polymerase  $\delta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4865-4869.
- Kunkel, T.A. and Soni, A. (1987). Exonucleolytic proofreading enhances the fidelity of DNA synthesis by chick embryo DNA polymerase- $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, **263**, 4450-4459.
- Kushner, S.R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. En: Genetic engineering, p.17. (Eds.: Boyer, H.B. and Nicosia, S.). Elsevier/North Holland. Amsterdam.
- Lackey, D., Krauss, S.W. and Linn, S. (1985). Characterization of DNA polymerase I\*, a form of DNA polymerase I found in *Escherichia coli* expressing SOS functions. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3178-3184.
- Lacks, S. (1966). Integration-efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics*, **53**, 207-235.
- Lacks, S. (1968). Genetic regulation of maltosaccharide utilization in pneumococcus. *Genetics*, **60**, 685-706.
- Lacks, S. (1970). Mutants of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonucleases and other activities possibly pertinent to genetic transformation. *J. Bacteriol.*, **101**, 373-383.
- Lacks, S.A. (1983). Modes of DNA interaction in bacterial transformation. Proceedings of the XV International Congress of Genetics. p. 149-158.
- Lacks, S.A., Greenberg, B. and Neuberger, M. (1975). Identification of a deoxyribonuclease implicated in genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **123**, 222-232.

- 
- Lacks, S.A., López, P., Greenberg, B. and Espinosa, M. (1986). Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J. Mol. Biol.*, **192**, 753-765.
- Lacks, S.A. Springhorn, S.S. and Rosenthal, A.L. (1979). Effect of the composition of sodium dodecyl sulfate preparations on the renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **100**, 357-363.
- Lacks, S.A., Stassi, D.L., López, P., Espinosa, M. and Greenberg, B. (1982). Effect of chromosomal homology on plasmid transfer and transformation in *Streptococcus pneumoniae*. p. 130-133. In Schlessinger (ed.), *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Laskey, R.A. and Mills, A.D. (1975). Quantitative film detection of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, **56**, 335-341.
- Lawyer, F.C., Staffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R. and Gelfand, D.H. (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6427-6437.
- Leavitt, M.C. and Ito, J. (1989). T5 DNA polymerase: structural-functional relationships to other DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4465-4469.
- Lin, H-J., Cannon, G.C. and Heinhorst, S. (1990). Purification and characterization of a DNA polymerase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6659-6663.
- Lipman, D.J. and Pearson, W.R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*, **227**, 1435-1441.
- Longley, M.J., Bennett, S.E. and Mosbaugh, D.W. (1990). Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7317-7322.
- López, P., Espinosa, M., Greenberg, B. and Lacks, S.A. (1984a). Generation of deletions in pneumococcal *mal* genes cloned in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5189-5193.

- 
- López, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1984b). Physical structure and genetic expression of sulfonamide-resistance plasmid pLS80 and its derivatives in *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **195**, 402-410.
- López, P., Espinosa, M., Stassi, D.L. and Lacks, S.A. (1982). Facilitation of plasmid transfer in *Streptococcus pneumoniae* by chromosomal homology. *J. Bacteriol.*, **150**, 692-701.
- López, P., Martínez, S., Díaz, A., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1989). Characterization of the *polA* gene of *Streptococcus pneumoniae* and comparison of the DNA PolII it encodes to homologous enzymes from *Escherichia coli* and phage T7. *J. Biol. Chem.*, **264**, 4255-4263.
- Lundberg, K., Shoemaker, D.D., Adams, M.W.W., Short, J.M., Sorge, J.A. and Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, **108**, 1-6.
- Lundquist, R.C. and Olivera, B.M. (1982). Transient generation of displaced single-stranded DNA during nick translation. *Cell*, **31**, 53-60.
- Majumder, S. and Novick, R.P. (1988). Intermediates in plasmid pT181 DNA replication. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 2897-2912.
- Maki, H., Bryan, S.F., Horiuchi, T. and Moses, R.E. (1989). Suppression of *dnaE* nonsense mutations by *pcbA1*. *J. Bacteriol.*, **171**, 3139-3143.
- Maki, H. and Kornberg, A. (1985). The polymerase subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. II Purification of the  $\alpha$  subunit, devoid of nuclease activities. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12987-12992.
- Maki, H. and Kornberg, A. (1987). Proofreading by DNA polymerase III of *Escherichia coli* depends on cooperative interaction of the polymerase and exonuclease subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4389-4392.
- Maki, H., Maki, S. and Kornberg, A. (1988). DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. IV The holoenzyme is an asymmetric dimer with twin active sites. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6570-6578.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual.*

---

Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.

- Mannarelli, B.M., Balganesch, T.S., Greenberg, B., Springhorn, S.S. and Lacks, S.A. (1985). Nucleotide sequence of the DpnII DNA methylase gene of *Streptococcus pneumoniae* and its relationship to the *dam* gene of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 4468-4472.
- Marcy, A.I., Olivo, P.D., Challberg, M.D. and Coen, D.M. (1990). Enzymatic activities of overexpressed herpes simplex virus DNA polymerase purified from recombinant baculovirus-infected insect cells. Nucl. Acids Res., **18**, 1207-1215.
- Martínez. S., López, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1986). Cloning of a gene encoding a DNA polymerase-exonuclease of *Streptococcus pneumoniae*. Gene, **44**, 79-88.
- Martínez. S., López, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1987). Complementation of *Bacillus subtilis* *polA* mutants by DNA polymerase I from *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Gen. Genet., **210**, 203-210.
- Matson, S.W., Bambara, R.A. (1981). Short deoxyribonucleic acid repair patch length in *Escherichia coli* is determined by the processive mechanism of deoxyribonucleic acid polymerase I. J. Bacteriol., **146**, 275-284.
- Matson, S.W., Capaldo-Kimball, F.N. and Bambara, R.A. (1978). On the processive mechanism of *Escherichia coli* DNA polymerase I. The *polA5* mutation. J. Biol. Chem., **253**, 7851-7856.
- Matsumoto, K., Takano, H., Kim, C.I. and Hirokawa, H. (1989). Primary structure of bacteriophage M2 DNA polymerase: conserved segments within protein-priming DNA polymerases and DNA polymerase I of *Escherichia coli*. Gene, **84**, 247-255.
- Maxam, A.H. and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol., **65**, 499-560.
- McHenry, C.S. (1991). DNA polymerase III holoenzyme. Components, structure, and mechanism of a true replicative complex. J. Biol. Chem., **266**, 19127-19130.
- Muro, P.A.M. (1992). NucA, una nucleasa de baja especificidad de sustrato de las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos. Universidad de Sevilla.

- 
- Noirot, P., Bargonetti, J. and Novick, R.P. (1990). Initiation of rolling-circle replication in pT181 plasmid: Initiator protein enhances cruciform extrusion at the origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8560-8564.
- Olivera, B.M. and Bonhoeffer, F. (1974). Replication of *Escherichia coli* requires DNA polymerase I. *Nature*, **250**, 513-514.
- Ollis, D.L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N.G. and Steitz, T.A. (1985a). Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature*, **313**, 762-766.
- Ollis, D.L., Kline, C. and Steitz, T.A. (1985b). Domain of *Escherichia coli* DNA polymerase I showing sequence homology to T7 DNA polymerase. *Nature*, **313**, 818-819.
- Ott, J. and Eckstein, F. (1987). Protection of oligonucleotide primers against degradation by DNA polymerase I. *Biochemistry*, **26**, 8237-8241.
- Ott, R.W., Goodman, L.E. and Ganesan, A.T. (1987). Expression of the *Bacillus subtilis* *polC* gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **207**, 335-341.
- Papanicolaou, C., Lecomte, P. and Ninio, J. (1986). Mnemonic aspects of *Escherichia coli* DNA polymerase I. Interaction with one template influences the next interaction with another template. *J. Mol. Biol.*, **189**, 435-448.
- Platt, T. (1986). Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 339-372.
- Polesky, A.H., Dahlberg, M.E., Benkovic, S.J., Grindley, N.D.F. and Joyce, C.M. (1992). Side chains involved in catalysis of the polymerase reaction of DNA polymerase I from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8417-8428.
- Polesky, A.H., Steitz, T.A., Grindley, N.D.F. and Joyce, C.M. (1990). Identification of residues critical for the polymerase activity of the Klenow fragment of DNA polymerase I from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 14579-14579.
- Pons, M.E., Díaz, A., Lacks, S.A. and López, P. (1991). The polymerase domain of *Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I. High expression, purification and



- characterization. Eur. J. Biochem., **201**, 147-155.
- Projan, S.J., Carleton, S. and Novick, R.P. (1983). Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. Plasmid, **9**, 182-190.
- Ptashne, M., Backman K., Humayun, M.Z., Jeffrey, A., Maurer, R., Meyer, B. and Sauer, R.T. (1976). Autoregulation and function of a repressor in bacteriophage lambda. Science, **194**, 156-161.
- Puyet, A., Greenberg, B. and Lacks, S.A. (1989). The *exoA* gene of *Streptococcus pneumoniae* and its product, a DNA exonuclease with apurinic endonuclease activity. J. Bacteriol., **171**, 2278-2286.
- Que, B.G., Downey, K.M. and So, A.G. (1978). Mechanism of selective inhibition of 3' to 5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I by nucleoside 5'-monophosphates. Biochemistry, **17**, 1603-1606.
- Reha-Krantz, L.J. (1992). Are there highly conserved DNA polymerase 3'→5' exonuclease motifs?. Gene, **112**, 133-137.
- Reha-Krantz, L.J., Stocki, S., Nonay, R.L., Dimayuga, E., Goodrich, L.D., Konigsberg, W.H. and Spicer, E.K. (1991). DNA polymerization in the absence of exonucleolytic proofreading *in vivo* and *in vitro* studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 2417-2421.
- Rhee, D.-K. and Morrison, D.A. (1988). Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: molecular cloning and characterization of *recP*, a gene required for genetic recombination. J. Bacteriol., **170**, 630-637.
- Rosenberg, M. and Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Ann. Rev. Genet., **13**, 319-353.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1987). Vector for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. Gene, **56**, 125-135.
- Rosenthal, A.L. and Lacks, S.A. (1977). Nuclease detection in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., **80**, 76-90.
- Ruscitti, T., Polayes, D.A., Karu, A.E. and Linn, S. (1992). Selective immunoneutralization

- 
- of the multiple activities of *Escherichia coli* DNA polymerase I supports the model for separate active sites and indicates a complex 5' to 3' exonuclease. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16806-16811.
- Ruscitti, T.M., Polayes, D.A., Martin S.A. and Linn, S. (1988). Characterization of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J. Cell. Biol.*, **107**, p. 228a.
- Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 39-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Sanjanwala, B. and Gasesan, A.T. (1991). Genetic structure and domains of DNA polymerase III of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **226**, 467-472.
- Saunders, C.W. and Guilt, W.R. (1980). Properties and transforming activities of two plasmids in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.*, **180**, 573-578.
- Saunders, C. W. and Guilt, W.R. (1981). Monomer plasmid DNA transforms *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.*, **181**, 57-62.
- Savic, D.J., Jankovic, M. and Kostic, T. (1990). Cellular role of DNA polymerase I. *J. Basic. Microbiol.*, **30**, 769-784.
- Sayers, J.R. and Eckstein, F. (1990). Properties of overexpressed phage T5 D15 exonuclease. Similarities with *Escherichia coli* DNA polymerase I 5'→3' exonuclease. *J. Biol. Chem.*, **265**, 18311-18317.
- Scherer, G.F.E., Walkinshaw, D.W., Arnott, S. and Morré D.J. (1980). The ribosome binding sites recognized by *E. coli* ribosomes have regions with signal character in both the leader and protein coding segments. *Nucl. Acid. Res.*, **8**, 3895-3907.
- Schneider, T.D., Stormo, G.D., Gold, L. and Ehrenfeucht, A. (1986). Information content of binding sites on nucleotide sequence. *J. Mol. Biol.*, **188**, 415-431.

- Setlow, P. (1974). DNA polymerase I from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, **29**, 3-13.
- Setlow, P. and Kornberg, A. (1972). Deoxyribonucleic acid polymerase: two distinct enzymes in one polypeptide. II A proteolytic fragment containing the 5'→3' exonuclease function from the two proteolytic fragments. *J. Biol. Chem.*, **247**, 232-240.
- Sharma, R.C. and Smith, K.C. (1987). Role of DNA polymerase I in postreplication repair: a reexamination with *Escherichia coli*  $\Delta$ *polA*. *J. Bacteriol.*, **169**, 4559-4564.
- Shaw, W.V. (1975). Chloramphenicol resistant bacteria. *Methods Enzymol.*, **43**, 737-755.
- Sicard, N. and Estevenon, A.M. (1990). Excision-repair capacity in *Streptococcus pneumoniae*: cloning and expression of a *uvr*-like gene. *Mutation Res.*, **235**, 195-201.
- Sicard, N., Oreglia, J. and Estevenon, A.M. (1992). Structure of the gene complementing *uvr-402* in *Streptococcus pneumoniae*: homology with *Escherichia coli* *uvrB* and the homologous gene in *Micrococcus luteus*. *J. Bacteriol.*, **174**, 2412-2415.
- Siegal, G., Turchi, J.J., Jessee, C.B., Mallaber, L.M., Bambara, R.A. and Myers, T.W. (1992). Structural relationships between two forms of DNA polymerase  $\epsilon$  from calf thymus. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3991-3999.
- Soengas, M.S., Esteban, J.A., Lázaro, J.M., Bernad, A., Blasco, M.A., Salas, M. and Blanco, L. (1992). Site-directed mutagenesis at the ExoIII motif of  $\phi$ 29 DNA polymerase; overlapping structural domains for the 3'-5' exonuclease and strand-displacement activities. *EMBO J.*, **11**, 4227-4237.
- Sollner-Webb, B. and Reeder, R.H. (1979). The nucleotide sequence of the initiation and termination sites for ribosomal RNA transcription in *X. laevis*. *Cell*, **18**, 485-499.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- Spanos, A., Sedgwick, S.G., Yarranton, G.I., Hübscher, U. and Banks, G.R. (1981). Detection of the catalytic activities of DNA polymerases and their associated exonucleases following SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* **9**, 1825-1839.
- Spicer, E.K., Rush, J., Fung, C., Reha-Krantz, L.J., Karam, J.D. and Konigsberg, W.H. (1988). Primary structure of T4 DNA polymerase. Evolutionary relatedness to eukaryotic

- 
- and other prokaryotic DNA polymerases. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7478-7486.
- Sprenghart, M.L., Fatscher, H.P. and Fuchs, E. (1990). The initiation of translation in *E. coli*: apparent base pairing between the 16SrRNA and downstream sequences of the mRNA. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 1719-1723.
- Stassi, D.L., Dunn, J.J. and Lacks, S.A. (1982). Nucleotide sequence of DNA controlling expression of genes for maltosaccharide utilization in *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, **20**, 359-366.
- Stassi, D.L., López, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1981). Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7028-7032.
- Stoker, N.G., Fairweather, N.F. and Spratt, B.G. (1982). Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene*, **18**, 335-341.
- Studier, F.W. and Moffat, B.A. (1986). Selective expression of cloned genes directed by T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H. and Dunn, J.J. (1989). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, **185**, 60-89.
- Suiba, N.L. and Kogoma, T. (1986). Concatemer formation of ColE1-type plasmids in mutants of *Escherichia coli* lacking RNase H activity. *J. Mol. Biol.*, **189**, 389-399.
- Sweasy, J.B. and Loeb, L.A. (1992). Mammalian DNA polymerase  $\beta$  can substitute for DNA polymerase I during DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1407-1410.
- Tabor, S., Huber, H.E. and Richardson, C.C. (1987). *Escherichia coli* thioredoxin confers processivity on the DNA polymerase activity of the gene 5 protein of bacteriophage T7. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16212-16223.
- Tindall, K.R. and Kunkel, T.A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, **27**, 6008-6013.
- Vieira, J. and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, **19**, 259- 268.

- 
- Wahl, A.F., Hockensmith, J.W., Kowalski, S. and Bambara, R.A. (1983). Alternative explanation for excision repair deficiency cause by the *polAex1* mutation. *J. Bacteriol.*, **155**, 922-925.
- Wang, T.S-F., Wong, S.W. and Korn, D. (1989). Human DNA polymerase  $\alpha$ : predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases. *FASEB J.*, **3**, 14-21.
- Wong, S.W., Wahl, A.F., Yuan, P-M., Arai, N., Pearson, B.E., Arai, K-I., Korn, D., Hunkapiller, N.W. and Wang, T.S-F. (1988). Human DNA polymerase  $\alpha$  gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO J.*, **7**, 37-47.
- Wu, C.A., Zechner, E.L. and Marians, K.J. (1992). Coordinated leading- and lagging -stranded synthesis at the *Escherichia coli* DNA replication fork. I Multiple effectors act to modulate okazaki fragment size. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4030-4044.
- Zhang, J., Chung, D.W., Tan, C-K., Downey, K.M., Davie, F.N. and So, A.G. (1991). Primary structure of the catalytic subunit of calf thymus DNA polymerase  $\delta$ : sequence similarities with other DNA polymerases. *Biochemistry*, **30**, 11742-11750.
- Zhu, W. and Ito, J. (1992). The highly conserved lysine residue in family B. DNA polymerases is required for protein-primed initiation and polymerization by PRD1 DNA polymerase. *J. Cell. Biochem.*, **16B**, 33.