



CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA
GENETICA Y BIOTECNOLOGIA / U N A M

11261
229
9

DETERMINACION DE UNA REGION HACIA ARRIBA DEL PROMOTOR, REQUERIDA PARA
LA TRANSCRIPCION OPTIMA DEL PRIMERO DE REPLICACION DEL PLASMIDO pBR327

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA
EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

HILDA MARIA LOMELI BUYOLI

ASESOR

Dr. XAVIER SOBERON MAINERO

1987

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION	1
Aspectos generales sobre la replicación	1
Aspectos generales sobre plásmidos	4
Replicación de plásmidos tipo ColE1	6
Señales transcripcionales en bacterias	9
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.....	19
MATERIALES Y METODOS	24
RESULTADOS	29
A. Construcciones de plásmidos	29
B. Determinaciones de número de copias	32
C. Construcciones en pK01	34
D. Medición de actividades de galactokinasa	36
DISCUSION	37
RESUMEN	43
BIBLIOGRAFIA	46

INTRODUCCION

ASPECTOS GENERALES SOBRE LA REPLICACION

La transferencia del material hereditario de un organismo a su progenie se basa en la duplicación del ácido desoxirribonucleico para luego proceder a la transmisión de una copia y con ella la información genética que contiene (Avery, 1944; Hershey, 1952). Dicha información genética, ya en el interior de un organismo y en condiciones biológicas adecuadas, se manifiesta de acuerdo a los flujos de información contemplados en el Dogma Central de la Biología Molecular (Crick, 1970), el cual básicamente señala que la expresión de la información genética se da en el sentido ácido nucleico-proteína y nunca al contrario.

Aun cuando entre los organismos es posible observar genomas de DNA o de RNA, tanto de cadena sencilla como doble, y aunque sus mecanismos de duplicación pueden diferir ampliamente, todos sin excepción operan con base en la especificidad de apareamiento de bases: adenina con timina y guanina con citosina. Este hecho esencial fue derivado de los trabajos clásicos de Watson y Crick (1953), que postularon el modelo de la doble hélice para el DNA; y de Messelson y Stahl quienes propusieron el mecanismo semiconservativo de la replicación.

En estudios posteriores se determinó que la elongación de una cadena es catalizada por enzimas que fueron denominadas DNA polimerasas dirigidas por DNA (Kornberg et al, 1958). Estas enzimas se han encontrado en extractos de todas las células bacterianas, vegetales y animales donde la síntesis de DNA se ha medido. En E.coli las enzimas encargadas de polimerizar DNA que se conocen son, la polimerasa I de Kornberg, y las polimerasas II y III.

El aislamiento y caracterización de las DNA polimerasas así como el estudio de mutantes de replicación en E.coli permitieron la posterior elucidación de los principales eventos del proceso replicativo. De esta manera fue determinado el papel esencial de un templado de DNA para la elongación, dada su función de patrón sobre el que es adicionado selectivamente cada deoxinucleótido (dNTP), según el principio de la complementariedad. Así mismo se identificó la participación de otra molécula de ácido nucleico

(DNA o RNA), que se aparea con el templado y que aporta un extremo 3' a partir del cual se inicia una nueva cadena. Esta molécula se ha llamado primero y se sabe que en ausencia de ella no puede iniciarse la replicación. Por otra parte, fue dilucidada la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo 3' en el extremo creciente del "primero" y el grupo fosfato 5' del dNTP entrante, se dice por ello que el sentido de la biosíntesis es 5'-3' (5' a 3').

La replicación procede secuencialmente a lo largo del cromosoma y siempre a partir del mismo origen. En experimentos autorradiográficos, el avance de la replicación se observa como una horquilla debido a la apertura de la doble cadena en el punto de crecimiento. Dos patrones de replicación serían consistentes con la síntesis secuencial a partir de un punto establecido: Una que implica un avance unidireccional y otro que significa un avance bidireccional. Se sabe que en *E. coli* la replicación ocurre bidireccionalmente (Lewin, 1982). Por otro lado, los análisis autorradiográficos de su horquilla de replicación, han permitido proponer modelos para explicar la replicación de las dos cadenas de la doble hélice. Uno de ellos predice en la región de la horquilla un espacio transitorio de cadena sencilla sobre un lado del dúplex, mientras que el otro está siendo replicado. Es decir, que una cadena (guía o "leading") se replica primero y la otra (rezagada o "lagging"), lo hace posteriormente.

El trabajo de R. Okazaki (1968), entre otros, ha provisto evidencias a favor de un proceso de replicación semidiscontinua, es decir que la síntesis es continua en la cadena guía, y discontinua en la rezagada.

Un modelo propuesto recientemente que igualmente contempla la replicación simultánea de ambas cadenas en pequeños trechos de DNA, sugiere la participación de una polimerasa dimerica asociada a un conjunto de proteínas replicativas denominado "primosoma" y a una o más proteínas helicicas, todo reunido en una estructura hipotética denominada replisoma (Kornberg, 1982). La polimerasa III ha sido relacionada con el primosoma. Esta enzima es dimerica y tiene un sitio activo en cada subunidad. Igualmente se ha asociado a este conjunto de proteínas, la proteína dnaG llamada

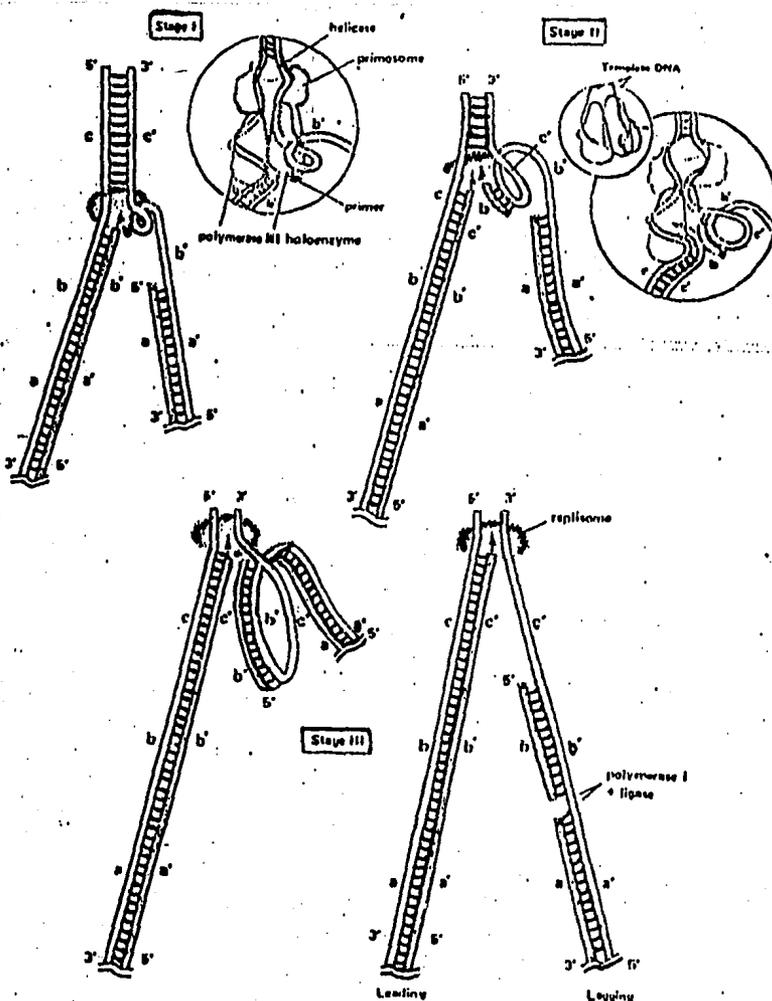
primasa, ya que puede sintetizar un "primero" de DNA. La apertura del dúplex durante la replicación podría resultar de la acción de helicasas tales como la proteína rep, capaz de desenrollar la cadena 3 a 5 y la helicasa II que actúa sobre la cadena 5' a 3'.

Actualmente se tiene una lista de 15 enzimas (alrededor de 30 polipéptidos) asociadas a replicación y bien podrían ser descubiertos componentes adicionales del primosoma, helicasas y subunidades de la polimerasa III.

Dentro del cromosoma, el evento de replicación se inicia a partir de secuencias nucleotídicas únicas llamadas orígenes de replicación. Alrededor del origen de replicación existen regiones que contienen el material genético necesario para que un fragmento de DNA pueda replicarse autónomamente, así como las señales que regulan la frecuencia de su inicio. Estas regiones en conjunto constituyen lo que es denominado un replicón. El cromosoma de un procarionte, así como otros replicones circulares de tipo extracromosomal, tienen generalmente un origen de replicación, los cromosomas lineales de eucariotes, en cambio, tienen muchos orígenes de replicación, usualmente separados por 30 a 100 kilobases (Watson et al, 1977).

Los mecanismos que regulan la replicación en bacterias no han sido totalmente elucidados, en cambio los que regulan el inicio de replicación de replicones extracromosomales, tales como los plásmidos, han sido estudiados detalladamente debido a su facilidad de manipulación en el laboratorio. Mas adelante se detallará el modelo de regulación de la replicación descrito para plásmidos tipo ColE1 ya que esta directamente relacionado con este trabajo. Con este propósito, se mencionarán a continuación algunos aspectos generales respecto a plásmidos que enmarquen mejor la presentación.

Figura 1. Esquema propuesto para la replicación concurrente de las cadenas guía y retardada por una polimerasa dimerica asociada con el primosoma y una o más helicasas en un replisoma. Etapa I. En la cadena guía la replicación está siempre mas avanzada, por lo que las regiones replicadas simultaneamente no son complementarias. Etapa II. Al plegar la cadena rezagada 180, se logra la misma orientación 3'-5' de la cadena guía en la horquilla. Etapa III. El primero producido por el primosoma es extendido por la polimerasa, al paso del primosoma sobre la cadena rezagada. Al acercarse la síntesis al extremo 5' del fragmento anterior, la cadena rezagada es liberada. El replisoma volverá a empezar.



Partición.

Las propiedades de un plásmido que determinan que pueda mantenerse establemente en una población de bacterias de crecimiento exponencial son principalmente, la partición y el número de copias y en algunos casos, el control de la división celular y la recombinación sitio-específica.

Algunos plásmidos se mantienen en bajo número de copias, debido a que están acoplados al proceso replicativo del cromosoma bacteriano. Estos plásmidos, tienen un mecanismo de partición que les garantiza que puedan ser transmitidos fielmente durante la división celular. Ejemplo de ellos son, RI y pSC101. Otros plásmidos no cuentan con un control estricto de su partición y lo que asegura cierta fidelidad de transmisión en una división celular, a pesar de su segregación aleatoria, es su alto número de copias que puede ser de 10 a 200. Ejemplo de estos plásmidos son el ColE1, pMB1, CloDF13, etc.

Replicación.

La replicación de un plásmido es controlada de tal manera que un determinado plásmido en un huésped, bajo determinadas condiciones, esta presente en un número de copias promedio definido. Teóricamente esto podría llevarse a cabo por saturación cinética, donde la replicación sería controlada por una reacción de velocidad-limitante dependiente del huésped. Sin embargo, todos los plásmidos estudiados hasta el momento, regulan su propia replicación a través de su información genética y mediante un control negativo (Helinski et al, 1985). El principal inhibidor de la replicación puede ser una proteína (λ dv), un RNA (CloDF13, pT15, ColE1, FII, etc), o una serie de repeticiones directas (RK2, R6K, P II, RSF1010, pSC101, etc).

En la mayoría de los casos la replicación del DNA plasmídico hace uso del conjunto de enzimas utilizadas para replicar el cromosoma huésped, de hecho algunos plásmidos se acoplan en este proceso al cromosoma bacteriano, si bien se cree que los principios que usa el cromosoma bacteriano para replicarse son distintos a los que usa el plásmido.

Actualmente, se ha encontrado que el control de la

replicación de plásmidos es un proceso mas complejo de lo que se había esperado y se cuenta con por lo menos cuatro esquemas bien descritos para el control de la replicación. De ellos el que concierne al presente trabajo es el de los plásmidos tipo Cole1 y por lo tanto solo éste será discutido con detalle.

REPLICACION DE PLASMIDO TIPO Cole1.

Dentro de este grupo de plásmidos son considerados, al menos: pMB1 (del cual deriva pBR322), p15A, RSF1030, CloDF13 y el mismo Cole1. Todos ellos son replicados unidireccionalmente por un mecanismo que depende de enzimas de la bacteria huésped E. coli tales como polimerasa de RNA, polimerasa I de DNA y RNAsaH. Estos plásmidos contienen varias regiones de extensa homología en la zona del origen de replicación (Selzer et al, 1983), de hecho la polimerasa I incorpora el primer dNTP en cualquiera de tres nucleótidos sucesivos ubicados en el mismo lugar de una zona de homología practicamente idéntica (Selzer et al, 1983; Tomizawa, 1977; Som et al, 1982).

La incorporación del primer dNTP requiere un extremo 3'OH, que es provisto por una molécula de RNA denominada "primero". La transcripción del "primero", también llamado RNAII, se inicia aproximadamente 550 pares de bases antes del origen (Itoh et al, 1980). Los transcritos nacientes forman un híbrido con el templado de DNA (Itoh et al, 1980). Cuando esto ocurre cerca del origen, la ribonucleasa H (RNAsaH) reconoce y procesa el híbrido en forma tal que se obtiene un primero para la replicación del DNA. La síntesis de DNA es continuada después de un tiempo por un mecanismo tipo primosoma que involucra otras proteínas de E. coli como polimerasa III, DnaB y DnaG.

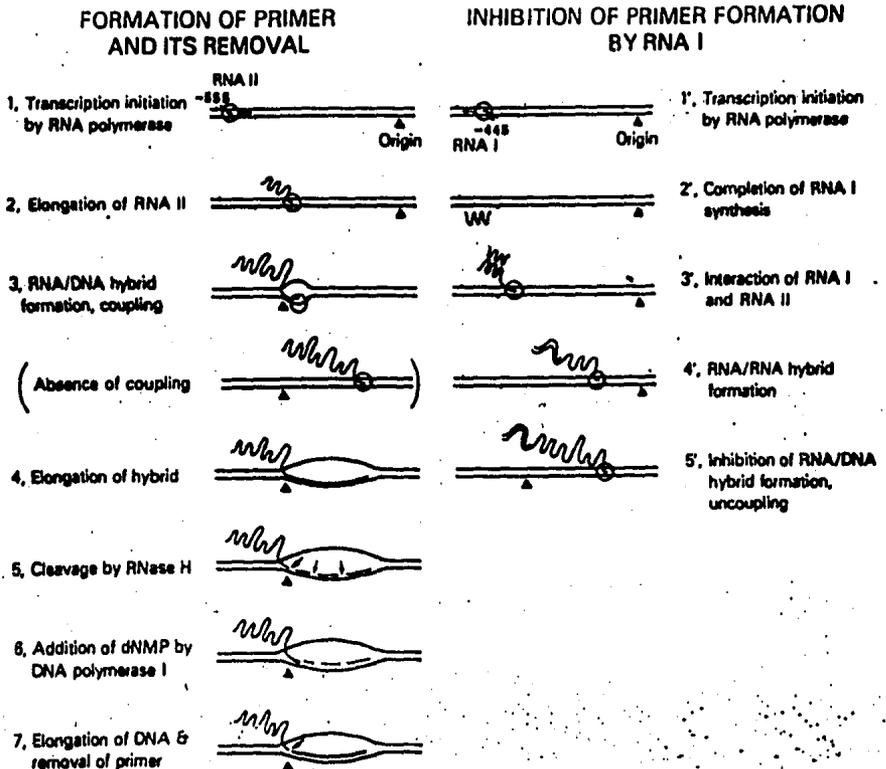
La formación del "primero" está regulada principalmente por una función especificada por el mismo plásmido. Se ha encontrado que una región localizada dentro de los 400 y 550 pares de bases antes del origen está involucrada en la regulación del número de copias (Tomizawa et al, 1984). En esta región se especifica otro transcrito además del RNAII, el RNA I (Tomizawa et al, 1982), cuya transcripción se inicia 445 pares de bases antes del origen; procede en dirección opuesta a la transcripción del RNA II (es

decir, se sobrelapa con él) y termina cerca del promotor del RNA II. Experimentos in vitro han demostrado que el RNA I es un inhibidor de la formación del "primero" (Masukata et al, 1984), ya que su interacción con el RNAII, impide la formación del híbrido RNAII/DNA templado. Es sabido que al menos los plásmidos Cole1, pBR322 y CloDF13, expresan adicionalmente la proteína ROP (o ROM), que de acuerdo a ciertos experimentos (Masukata et al, 1984), participa en el control de la replicación modulando la interacción del RNA I con el RNA "primero".

Se tienen algunas evidencias que sugieren que el RNA II debe adquirir una conformación particular durante la transcripción que le permite formar un "primero" funcional, es decir que las estructuras secundarias que se establecen a lo largo del RNA II juegan un papel importante en el control de eventos de procesamiento del origen. Se ha encontrado que cuando se impide la formación de estructura secundaria en el RNA II, debida a la sustitución de GMP por un análogo (IMP) que no puede formar puentes de hidrógeno con CMP, la formación del primero se ve inhibida (Lacatena et al, 1983; Tamm et al, 1983). Adicionalmente se han caracterizado mutaciones puntuales situadas entre el promotor del RNA II y ori que afectan la estructura secundaria del RNA II, así como la formación y estabilidad del híbrido DNA-RNA (Tomizawa et al, 1984). En estas mutantes se ha visto que el inicio de síntesis de DNA es menos frecuente, lo cual refleja que la formación del primero es menos eficiente. Así mismo se ha observado que estas mutaciones presentan accesibilidades distintas a RNAsa T4 y RNAsaA lo que significa que su RNA II tiene una conformación distinta (Tomizawa et al, 1981; Tomizawa et al, 1981b).

Por otro lado, una serie de evidencias respecto a la participación del RNA I en el control del número de copias, indican que esta molécula asume una conformación que comprende tres estructuras de tipo tallo-asa y una cola de cadena sencilla sobre el extremo 5'. Estas características son tales que su alteración espacial produce una disminución en la actividad del RNA I (Tomizawa et al, 1981). Así mismo, ciertos datos bioquímicos sugieren que el RNA I ejerce un control negativo sobre la

Figura 2. Ilustración esquemática de la formación del primero y su inhibición por RNA I. Una explicación de cada proceso se presenta en la figura y en la introducción. El dibujo entre paréntesis indica el proceso abortivo. Las líneas rectas representan las dos cadenas de DNA; líneas onduladas, transcritos de RNA y círculos pequeños, RNA polimerasa. El templado de DNA forma una estructura de "ojo" desde el origen de replicación de DNA (indicado por Δ) mientras el RNA hibridizado se elonga. Las flechas en la estructura del "ojo" en el paso 5 indican el corte en el RNA hibridizado por la RNasaH. Una flecha mas gruesa indica el sitio preferido de corte (Selzer y Tomizawa, 1982). Una línea gruesa en el "ojo" en los pasos 6 y 7 es una nueva cadena sintetizada de DNA.



replicación del plásmido debido a que interacciona con el RNA "primero" nascente y tiene un efecto sobre la susceptibilidad de este a un procesamiento por la RNAasaH (Tomizawa et al, 1981b). Se ha visto que si es adicionado durante etapas tempranas de la transcripción del RNA II in vitro, el RNA I se aparea a su región complementaria nascente y con ello se inhibe su procesamiento 400 nucleótidos adelante, o sea en el origen (figura 2). En contraste, el RNA I no tiene efecto si es adicionado después que se haya completado la transcripción del RNA II (Wong et al, 1985). Una explicación a este fenómeno es que una estructura temprana y transitoria del RNA II es sensible a la asociación con el RNA I y que otras estructuras alternativas del RNA "primero", RNA I-resistentes se van desarrollando conforme la transcripción procede (Wong et al, 1985).

Wong y Polisky han estudiado esta proposición, al examinar la estructura del RNA "primero" en etapas tempranas y tardías de su formación. El análisis enzimático de las estructuras secundarias sugiere que se forman dominios estructurales alternativos conforme el RNA "primero" va siendo transcrito (figura 3). Por otra parte, ellos han determinado las constantes de velocidad para la asociación de moléculas de RNA II de diferentes longitudes con el RNA I. Lo que estos experimentos demuestran es la existencia de una "ventana de susceptibilidad" discreta, temporal y dependiente de conformación del RNA II para el RNA I, ya que el RNA II en una etapa particular de su síntesis se asocia con el RNA I de 6 a 35 veces mas rápido que cuando tiene otras formas mas largas o mas cortas.

Estos últimos datos implican, en relación a la regulación negativa que se deriva de la interacción RNA I-RNA II, que el conocimiento en el estado estacionario de estos transcritos puede no ser suficiente para explicar como el número de copias de los plásmidos es mantenido in vivo, ya que el reporte de Wong y Polisky sugiere fuertemente que la cinética de interacción de estas moléculas esta también en función de la conformación del RNA "primero".

Finalmente lo que estos resultados parecen estar poniendo de manifiesto, es una estructura secundaria muy compleja a lo largo

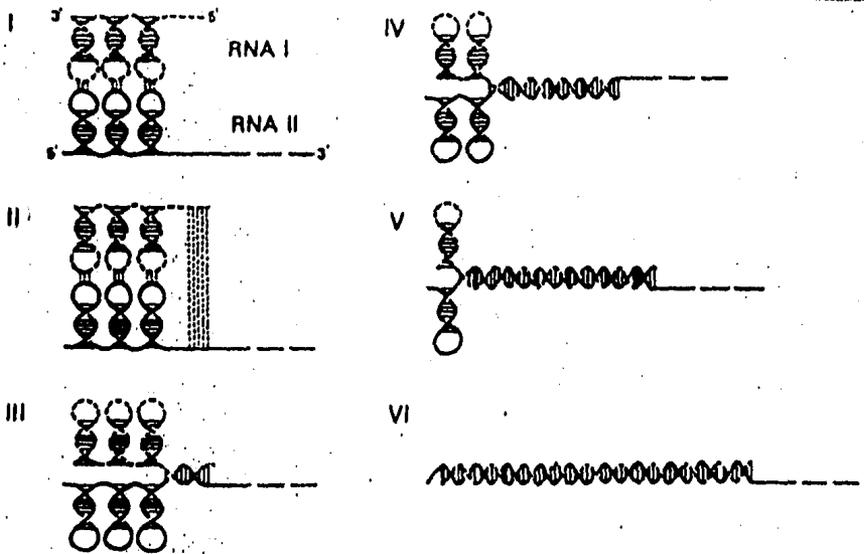


Fig 3. Ilustración esquemática del proceso de unión del RNA I y RNA II silvestres. El proceso por pasos se basa en los resultados descritos por Tomizawa - 1984. RNA I y RNA II interactúan por medio de los ojales de sus estructuras plegadas (paso I). Esta interacción facilita el apareo (paso II) que inicia en el extremo 5' del RNA I (paso III). En esta etapa, los contactos ojal-ojal pueden ser rotos. El apareo se propaga progresivamente sobre los palíndromes - III, II, I mientras que las estructuras tallo-ojal se disuelven (paso IV y V). Finalmente, el RNA I se hibridiza a lo largo, sobre el RNA II (paso VI). El análisis del proceso de apareamiento in vitro entre el RNA I y una porción del RNA II (transcrito de 240 nt, obtenido en un "run-off") se hizo a partir del cambio de sensibilidad del RNA I a RNasa T1 (endonucleasa que ataca al enlace fosfodiéster CpN), a diferentes tiempos de incubación. El efecto de distintas mutaciones sobre RNA I y RNA II, sugirió que la interacción inicial es entre estas estructuras plegadas a través del apareamiento de las bases complementarias en el centro de los palíndromes. La remoción de 5 nucleótidos del extremo 5' del RNA I, reduce sustancialmente su interacción con el RNA II. Probablemente el apareamiento empieza cerca extremo 5' del RNA I, etapa III.

del RNA II (figura 4), tal que ciertos cambios provocados por la interacción con el RNA I o por mutaciones puntuales, pueden generar estructuras alternativas que repercuten desfavorablemente en la calidad del RNA II como sustrato de la RNAasaH o de la polimerasa I de DNA, según sea el caso.

SENALES DE INICIO Y TERMINACION DE LA TRANSCRIPCION EN BACTERIAS

Como anteriormente se describió, para que el proceso de replicación pueda iniciar, es necesario que el DNA templado se aparee con un "prímero", el cual en algunos casos es una molécula de RNA y en otros de DNA. Los orígenes de replicación tipo ColE1, como ya se ha mencionado, utilizan un "prímero" de RNA. De esta forma un origen de replicación tipo ColE1 deberá tener una señal para que inicie la transcripción del "prímero" y consecuentemente la frecuencia con que inicie esta transcripción afectará directamente la frecuencia de replicación.

En función de lo anterior, será necesario incluir en este trabajo algunos conceptos sobre las señales que dan inicio y causan terminación de la transcripción en bacterias, así como de los mecanismos que la regulan.

La síntesis de RNA está definida por una variedad de señales específicas codificadas en el DNA, una de ellas es el sitio específico para el inicio de la transcripción (promotor) y otra el sitio de terminación de la transcripción para la RNA polimerasa.

La regulación transcripcional está dada por la modulación de la eficiencia con la cual la RNA polimerasa puede interactuar con estos sitios.

La secuencia de bases particular de DNA, con la que interacciona la RNA polimerasa, determina en parte la efectividad de un sitio de iniciación (promotor) o de un sitio de terminación. Así mismo, diferentes moléculas efectoras pueden influenciar positiva o negativamente esta interacción entre la RNA polimerasa y el DNA. En muchos casos, estas moléculas efectoras también reconocen una información contenida en la secuencia nucleotídica del DNA templado, la cual puede estar adyacente o sobrelapada con el sitio de acción de la RNA polimerasa (Goldberger et al, 1979).

a) Inicio de la transcripción

Promotores

El primer paso en la expresión de un gen es el evento de inicio de la transcripción, un proceso catalizado por la RNA polimerasa. El inicio de la transcripción es un evento preciso que ocurre en sitios específicos con orientaciones específicas en el cromosoma. Esta especificidad resulta del reconocimiento por la RNA polimerasa de secuencias de DNA llamadas promotores. La secuencia de un promotor determina la localización y orientación del extremo 5' del RNA mensajero y es un elemento importante en la determinación de la frecuencia del inicio de la transcripción.

Si bien un modelo simple ha bastado para definir la estructura de un promotor en E.coli, se conocen algunas excepciones a este modelo las cuales sugieren que posiblemente existan varias estructuras alternativas para diferentes promotores y esto a su vez pudiera reflejar una ruta distinta para el proceso del inicio de la transcripción para cada promotor (Reznikoff et al, 1985).

Estructura de un promotor.

El primer enfoque que se utiliza para definir la localización de un promotor es la identificación de mutaciones que alteran su reconocimiento por la RNA polimerasa. Estas mutaciones actúan afectando directamente la interacción promotor-RNA polimerasa. Sin embargo, un análisis utilizando metodologías de genética clásica no provee los detalles necesarios para definir la estructura de un promotor; para ello es necesario recurrir a un análisis de secuencia de DNA acompañado de una definición bioquímica del punto preciso de iniciación del mensajero. La utilidad de secuenciar un promotor resulta obvia: es la forma en que se puede determinar una estructura con la mayor finura posible. La determinación del punto de iniciación de un mensajero es también crítica ya que establece la orientación del promotor; todo esto permite hacer una comparación del promotor en cuestión, con otros promotores cuya secuencia es conocida.

Las conclusiones que han derivado de este tipo de análisis se resumen en la figura 5; una secuencia hexanucleotídica (TATAAT)

FIGURA.5

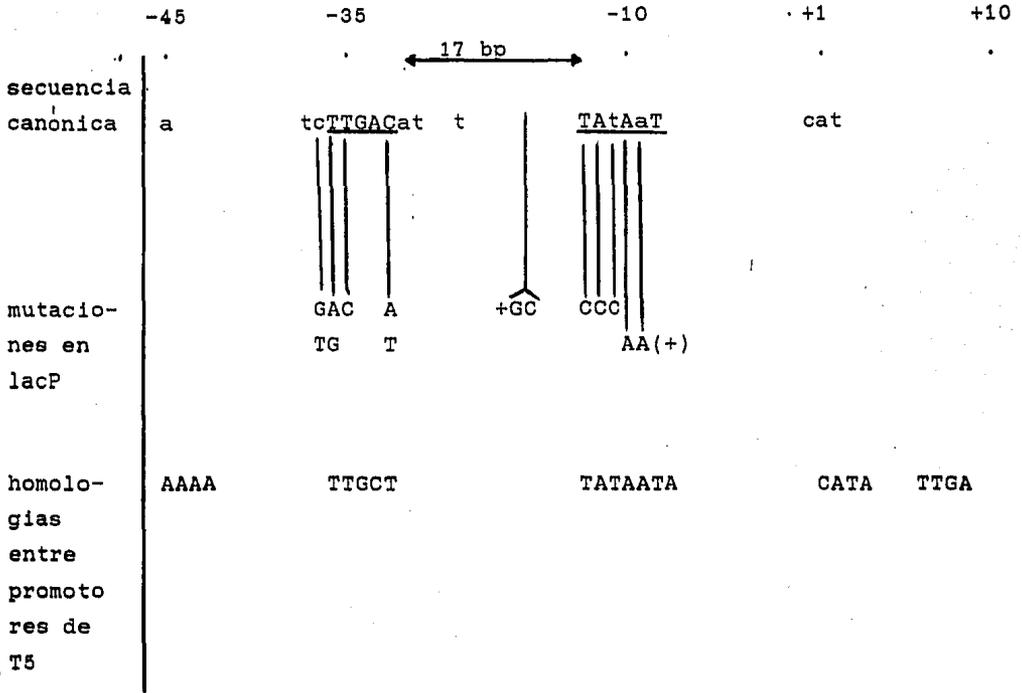


Fig.5. Estructura de un promotor para la holoenzima σ^{34} . Las mutaciones en lacP que se indican, decrecen todas la expresión de lacP, a menos que sean seguidas por un (+) (incremento en la expresión). Las homologías entre promotores de T5 se describen dentro del texto.

se centra diez pares de bases antes del punto de iniciación. Una segunda secuencia hexanucleotídica (TTGACA) se centra aproximadamente 35 p.b. arriba del punto de inicio. Aunque el espacio entre la región de -10 y la región de -35 es mas o menos variable, una distancia de 17 p.b. parece ser la mas frecuente (Hawley et al, 1983).

Los resultados que condujeron a estas generalizaciones son los siguientes: 1. Las secuencias descritas fueron encontradas en un análisis estadístico de mas de 100 promotores de E.coli. 2. La mayoría de las mutaciones que alteran la actividad de un promotor presentan cambios en su secuencia de una forma predecible. p.ej. mutaciones que aumentan la similitud de un promotor con el canónico propuesto, aumentan la actividad del promotor y viceversa (Youderian et al, 1982). 3. Se puede generar teóricamente una comparación de actividades de promotores, a través de la comparación de sus secuencias y esto coincide en forma general con su comportamiento real (Mulligan et al, 1984).

La subunidad de la RNA polimerasa que da especificidad al reconocimiento de un promotor es la proteína σ^{70} (Reznikoff et al, 1985). Además de esta proteína, hay otras subunidades σ así como otras RNA polimerasas (como las de algunos bacteriófagos), que obviamente reconocen como promotores secuencias distintas a las descritas. Una observación sorprendente es que la misma subunidad σ^{70} presenta varias excepciones respecto al patrón general de reconocimiento propuesto; dichas excepciones pueden proveer información interesante acerca de como ocurre el inicio de la transcripción y de como puede ser regulado. Algunos de estos comportamientos atípicos se mencionan a continuación:

- Hay ciertas mutaciones en promotores que no afectan ninguna de las secuencias canónicas descritas. Así por ejemplo en el promotor Lac existe la mutación P¹la (en -16), S7 (en +6) y P¹¹¹ (en +10) (Dickson et al, 1975; Maquat et al, 1980). Se han dado diversas hipótesis para explicar estas mutantes. Por su parte H. Bujard ha diseñado un análisis de secuencia comparativo, usando unicamente promotores extremadamente fuertes que programan la expresión del fago T5. Este análisis extendió la secuencia canónica al incluir

una secuencia AAAA cerca de -43, una secuencia TTGA hacia abajo, entre +5 y +9 y una tendencia general hacia la riqueza de A/T (Deuschle et al, 1986). Alternativamente otras posiciones en el promotor podrían ser reconocidas por la RNA polimerasa, pero ser significativas en el proceso global, solo cuando los sitios canónicos de reconocimiento no están presentes.

- Algunos promotores carecen de una de las secuencias canónicas (-10 o -35) sin que pueda observarse un efecto en la actividad del promotor. Un ejemplo es el promotor Pre*, una mutante del promotor LPre, que no tiene una región de -35 en lo absoluto, si bien presenta un -10 canónico (Reznikoff et al, 1985).

- El modelo de secuencias canónicas para promotores propuesto, predice que la información arriba de -35 no debía tener influencia sobre la actividad del promotor, lo cual se puede probar haciendo deleciones que progresivamente se aproximen a la región de -35.

Este tipo de estudio se ha hecho para LacUV5 obteniéndose los resultados esperados, es decir, que hacia arriba de -35 no se encuentran secuencias que afecten la eficiencia del promotor (Yu et al, 1985). Sin embargo algunos resultados distintos se han observado con otros promotores. Por ejemplo, en el caso de P115, al llegar a la posición de -42 se presenta un decremento de actividad de 3 veces (Yu et al, 1985). Estas deleciones podrían estar definiendo una secuencia que compensa por la ausencia de una secuencia canónica en la región de -35. Resultados mas dramáticos se han reportado para los promotores que inician las transcripciones de tyrT, rrnB, ilvIH, ilvG y la expresión de nifLA de K. pneumoniae. En estos casos deleciones que terminan desde 15 a 145 p.b. antes de -35 causan un decremento en la expresión del promotor de hasta 10 veces (Drumond et al, 1983). No se ha definido si estas deleciones tienen un efecto debido a que contienen alguna región específica o si es simplemente por modificarse su composición de bases.

Como se pueden explicar los efectos causados desde distancias tan lejanas con respecto a las secuencias canónicas? Acerca de esto se han planteado algunas explicaciones alternativas: Las secuencias hacia arriba del promotor podrían tener algun papel

regulatorio y no necesariamente constituir parte del promotor. Por ejemplo, podrían tener un sitio de unión para una proteína de regulación positiva, o un sitio donde actuara la DNA girasa, de tal forma que se pudiera generar y localizar la superhelicidad adecuada para la máxima actividad del promotor; otra posibilidad sería simplemente que estas secuencias representaran parte del promotor; finalmente, las secuencias en cuestión podrían afectar localmente la conformación del DNA por un efecto de "telestabilidad" (Botchan, 1976) generado en virtud de su secuencia o composición. Sería difícil definir si dado este caso, las secuencias hacia arriba del promotor podrían entrar en la definición de promotor.

- Las secuencias hacia abajo de las regiones canónicas pueden también afectar la actividad de algunos promotores, pero excepto por el análisis de secuencia para T5 descrito antes, esta posibilidad no se ha explorado aun.

b) Señales para la regulación de la transcripción.

Una de las conclusiones mas importantes que han derivado de los estudios hechos en el ultimo cuarto de siglo, es que la regulación de la actividad de un gene es con frecuencia el resultado de regular el inicio de su transcripción.

Los diversos mecanismos mediante los cuales la frecuencia del inicio de la transcripción puede ser afectada incluyen entre otros: (a) la acción de proteínas regulatorias que inhiben (reprimen) el inicio de la transcripción; (b) la acción de proteínas regulatorias que estimulan (activan) el inicio de la transcripción; y (c) la regulación de la topología del DNA.

La regulación negativa de la transcripción fue la primera en ser elucidada a través de los trabajos hechos con el operon lac y ha sido la mas ampliamente documentada. Sin embargo, en este texto no será revisada, ya que no concierne directamente a este trabajo.

1. Regulación positiva del inicio de la transcripción.

El descubrimiento de que muchos sistemas son positivamente regulados, es decir que la frecuencia de su inicio de

transcripción es aumentada por una proteína activadora, se debió principalmente a los trabajos de Englesberg con el regulón de arabinosa (Lee, 1978). Para ejemplificar este sistema aquí, se describirá la activación de la expresión de lacP, de la cual es responsable el complejo CAP-cAMP (proteína activadora catabólica-monofosfato de adenosín 3' 5' cíclico).

En este sistema se ha visto que el máximo nivel de la expresión de lac, así como de otros operones que codifican funciones catabólicas, es modulado por la presencia de otras fuentes de carbono en el medio tales como glucosa. La forma en que esto ocurre es la siguiente: Los productos catabólicos de glucosa influyen sobre la concentración de cAMP a través de un mecanismo que no se ha definido totalmente. cAMP se une con la proteína CAP y este complejo reconoce secuencias específicas en el DNA. Se sabe que tales secuencias se localizan alrededor del sitio de iniciación de la transcripción (deCombrugge et al, 1984). La unión de cAMP-CAP a su sitio de reconocimiento causa la activación de la transcripción, ya que facilita la unión de la RNA polimerasa al promotor (Watson, 1975).

2. Regulación del Inicio de la Transcripción a través de la Topología del DNA.

In vivo, el templado para la transcripción es una hélice superenrollada negativamente. Dado que la presencia y grado de superenrollamiento afectan la energía requerida para desnaturalizar cualquier región de la molécula y puesto que la formación de un complejo entre la RNA-polimerasa y el promotor implica la presencia de una zona localizada de DNA cadena sencilla (Siebenlist et al, 1980); el cambio de las características de superenrollamiento de un templado debería afectar las propiedades de su promotor, por lo tanto, éste podría ser un mecanismo para regular el inicio de la transcripción. De hecho, según reportes de Gellert (1981), el carácter superhelicoidal afecta las propiedades de un templado, si bien en una forma extraña, ya que algunos promotores son estimulados por el superenrollamiento negativo y otros son inhibidos. Los efectos de superhelicidad sobre el proceso del inicio de la transcripción, se ha mostrado en

numerosos estudios hechos in vitro (Malan et al, 1984) y en estudios in vivo, utilizando inhibidores de la girasa (Sanzey, 1979). Se sabe que la misma girasa regula el inicio de su transcripción en función de variaciones de la densidad del superenrollamiento y que esto tiene importancia fisiológica (Menzel et al, 1983).

c) Terminación de la transcripción.

El cromosoma de organismos procariotes está organizado a través de unidades transcripcionales. Tal organización implica que además de señales de inicio, existan señales de terminación que definan el extremo 3' de una unidad. Respecto al evento de terminación y las señales que lo hacen posible en procariotes, se encuentra una literatura muy extensa de la cual se mencionarán los aspectos mas importantes

Por analogía con los promotores, los terminadores pueden ser considerados "constitutivos" y "regulables" y esto guarda una estrecha correlación con factores de dependencia, ya sea para compensar una característica estructural ausente en la señal de terminación, o para lograr una mayor versatilidad en el proceso (Platt et al, 1986).

La idea inicial de que los sitios de terminación debían compartir características estructurales sólo ha resultado cierta para los casos mas simples, habiéndose encontrado una gran variedad y complejidad de señales sin relación alguna. Una característica general de la terminación es que, si bien la señales están codificadas en el DNA, el reconocimiento esta mediado por el RNA transcrito, siendo las propiedades estructurales mas importantes que las particularidades de su secuencia.

La señal mas simple capaz de causar terminación es una serie de residuos de uridina, precedidos de una región rica en GC, con una secuencia palindrómica que permite al transcrito naciente formar una estructura de tallo-asa. Esta estructura causa la terminación de un transcrito por sí misma, es decir sin la participación de factores proteicos. A este tipo de terminadores se les ha denominado rho independientes.

En situaciones mas elaboradas, como es el caso de la terminación dependiente de la proteína rho, las secuencia y estructura de las señales determinantes no muestra ninguna característica comun aparente.

De igual forma que en la terminación simple, las señales funcionales para la terminación dependiente de rho residen en el RNA y pueden involucrar una estructura secundaria; sin embargo, como se ha mencionado, el análisis de su secuencia solo ha permitido derivar ciertas características generales, estas son: (a) la secuencia contenida en la región de terminación no puede causar terminación por sí misma, (b) secuencias considerablemente arriba del punto donde cesa la transcripción inician la señal de terminación, aparentemente via interacciones entre rho y el mRNA, (c) una región comprendida en 80 p.b contiene toda la información requerida para que ocurra terminación, (d) la secuencia presente donde ocurre la terminación, no parece cumplir con ningún requerimiento de composición o especificidad (Platt et al, 1986).

Regulación de la terminación.

Polaridad

En E.coli los genes de operones policistronicos se expresan coordinadamente. Sin embargo se ha observado que puede haber diferencia en la expresión de un gen distal al promotor con respecto a un gene proximal que refleja su dependencia de parámetros externos (Danchin et al, 1980). Se sabe que esta diferencia es causada por terminación prematura de la transcripción que resulta del desacoplamiento de la transcripción y la traducción cuando esta ultima es interrumpida por codones de terminación o por otros mecanismos. Este fenomeno conocido como polaridad, parece ser comun a todos los operones policistronicos y puede ocurrir aun bajo condiciones normales de crecimiento, si bien se ve incrementado por temperatura (polaridad natural) o variaciones metabólicas específicas (polaridad metabólica).

El acoplamiento de la traducción y la transcripción ocurre de tal forma que los ribosomas traducen un mRNA tan pronto como este esta siendo sintetizado, por mecanismos que no están aun bien claros. Una de las consecuencias de esto es que se previene la

terminación de la transcripción dentro de regiones que codifican para una proteína. Se ha encontrado que la terminación en regiones codificantes para proteínas es absolutamente dependiente de rho en todos los casos que se ha examinado. Presumiblemente la terminación dependiente de rho es frecuente en secuencias que no han evolucionado específicamente como señales de terminación (Morgan, 1986).

Antiterminación

La expresión de diferentes genes y operones puede ser independientemente modificada a través de controlar el grado de terminación en un punto dado, haciendo uso de distintos mecanismos. Existen factores protéicos específicos que pueden reducir o prevenir la terminación, ya sea modificando la polimerasa o secuestrando la señal de terminación. Los sistemas de antiterminación mejor caracterizados involucran dos proteínas del bacteriófago λ : N y Q, que encienden la expresión de genes tempranos y tardíos durante el crecimiento lítico. Las propiedades de la proteína N han sido extensamente estudiadas (Greenblett, 1981) y se ha visto que la polimerasa modificada por N causa avance de la transcripción sobre un sitio de terminación tanto rho dependiente como independiente. Existen requerimientos adicionales para este sistema: un sitio utilizado por N, que actúa en cis (nut), las proteínas del huésped nus y otros componentes aun no identificados.

La antiterminación causada por la proteína Q ha sido menos estudiada, si bien se ha identificado en el DNA un sitio de utilización de Q (qut) y la participación de nusA.

Recientemente se ha encontrado en E. coli que en operones para RNAs ribosomales (operones rrrn), se da el fenómeno de antiterminación para señales rho-dependientes (Morgan, 1986). La idea de que los transcritos ribosomales debían presentar antiterminación surgió de los estudios de polaridad en operones que codifican para mRNAs que se traducen. El fenómeno de polaridad demostró que para que un mRNA sea eficientemente transcrito de un extremo a otro, es necesario el acoplamiento de la traducción y la transcripción. Este hecho condujo a hacer estudios que demostraban

que mecanismos de antiterminación en operones *rrn*, compensaban la falta de acoplamiento para reducir la terminación prematura. Aunque el sistema de antiterminación en *E. coli* no ha sido tan extensamente estudiado como el de *lambda*, se han encontrado ciertas similitudes, (por ejemplo homologías de secuencias con los sitios *nut* y la participación de las mismas proteínas *nut*). Sin embargo recientemente se han tenido evidencias que sugieren un mecanismo de antiterminación adicional mas simple que no involucra factores analogos a *N* y *Q*. Por ejemplo, se ha visto que los promotores *P1* y *P2* de *rrnC*, confieren capacidad de lectura por encima de una señal de terminación a través de secuencias que radican en sus regiones hacia arriba del promotor (Holben et al, 1985).

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

Por algún tiempo, el grupo de trabajo del cual formé parte durante mi maestría, tuvo como línea de investigación el desarrollo de vehículos de clonación. De esta forma, a partir de algunos proyectos concretos sobre la expresión de genes de E. coli, surgió la necesidad específica de construir un vector cuyo número de copias fuera regulable. Esta construcción era además interesante porque presentaba la posibilidad de ser ampliamente utilizada ya que, en muchos casos, particularmente en estudios de investigación básica, un vehículo es requerido en monocopia para acercarse mas a las condiciones en que normalmente se expresan los genes del cromosoma y en cambio, en otras etapas del mismo experimento (como en la purificación), es necesario tener el plásmido como multicopia.

Así pues, la obtención de un plásmido cuyo número de copias fuera regulable, se constituyó como uno de los proyectos del laboratorio. Como consecuencia de esto, nuestra necesidad de conocer los mecanismos que regulan la replicación de plásmidos pBRs se hizo patente.

La estrategia inicial para la regulación del número de copias consistió en la regulación del promotor del "primero" o RNA II, el cual como ya se mencionó en la introducción es el que determina la iniciación de la replicación en un punto dado del plásmido. Ya que los pBRs son plásmidos multicopia, para llevarlos a su estado de monocopia se intentaría reprimir al promotor mencionado mediante la inserción de un operador, en un sitio inmediatamente hacia arriba del promotor. El trabajo se llevó a cabo en el plásmido pBR327 por ser éste un plásmido pequeño en el cual se han deletado regiones dispensables que se encuentran presentes en pBR322. Esta característica del pBR327 hacía mas fácil la manipulación de la región que se ubica entre el promotor del RNA II y el gen de resistencia a ampicilina cuando se aplicaba selección para los dos genes de resistencia.

La estrategia mencionada involucró, en un principio, la generación de un sitio único de restricción necesario para la posterior inserción del operador en el lugar deseado. La creación

de tal sitio, pudo lograrse, mediante la deleción de un fragmento de Sau3A, obteniéndose el plásmido pBR-14 que contiene una secuencia de reconocimiento para BglII (figura 6). El pBR-14 sufrió una deleción que se inicia en la posición -44 con respecto al inicio de la transcripción del "primero" e incluye 920 p.b. mas que comprenden parte del gene de resistencia a ampicilina.

Es importante senalar aquí que, la deleción originalmente planeada para la creación del sitio para BglIII, implicaba la pérdida de un fragmento mucho menor (85 p.b.) comprendido entre los sitios -44 y -129 con respecto al promotor. Sin embargo esta deleción nunca pudo aislarse (de entre aproximadamente 500 colonias estudiadas). Cabe mencionar que el aislamiento del pBR-14 era un evento menos probable ya que fué encontrado como una cotransformante junto con el pBR327 (en el proceso de transformación es muy poco probable que dos plásmidos diferentes transformen una misma célula). Por otro lado el pBR-14 tiene un tamaño considerablemente menor al de la deleción provocada originalmente.

Estas observaciones, nos condujeron a hacer un análisis de otros plásmidos obtenidos (aquellos en los que no se había generado un sitio pero que habían experimentado algun cambio) y encontramos que en ninguno de ellos se perdía la secuencia que originalmente pretendíamos deletar, ya fuera porque ocurrían repeticiones, o porque ocurrían deleciones en otros sitios. Todo lo anterior nos sugirió que el fragmento que quería deletarse inicialmente contenía una secuencia importante para la replicación del plásmido.

Haciendo una comparación de la secuencia contenida en el pBR327 con la que en el pBR-14 la sustituyó (la inmediata al sitio de BglII, a partir de -44), encontramos que la secuencia presente en el primero es muy similar en el pBR-14 a partir de la sexta base y hasta la base correspondiente a la posición -55.

pBR327 5' AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGCTAAATCTGCTGCT3'
pBR-14 5' G⁻³⁶TA⁻¹⁰AAAAGATGCTGAAGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGCTAAATCTGCTGCT3'
-36 -10

Además, fue comparada la secuencia contenida en el pBR327 con

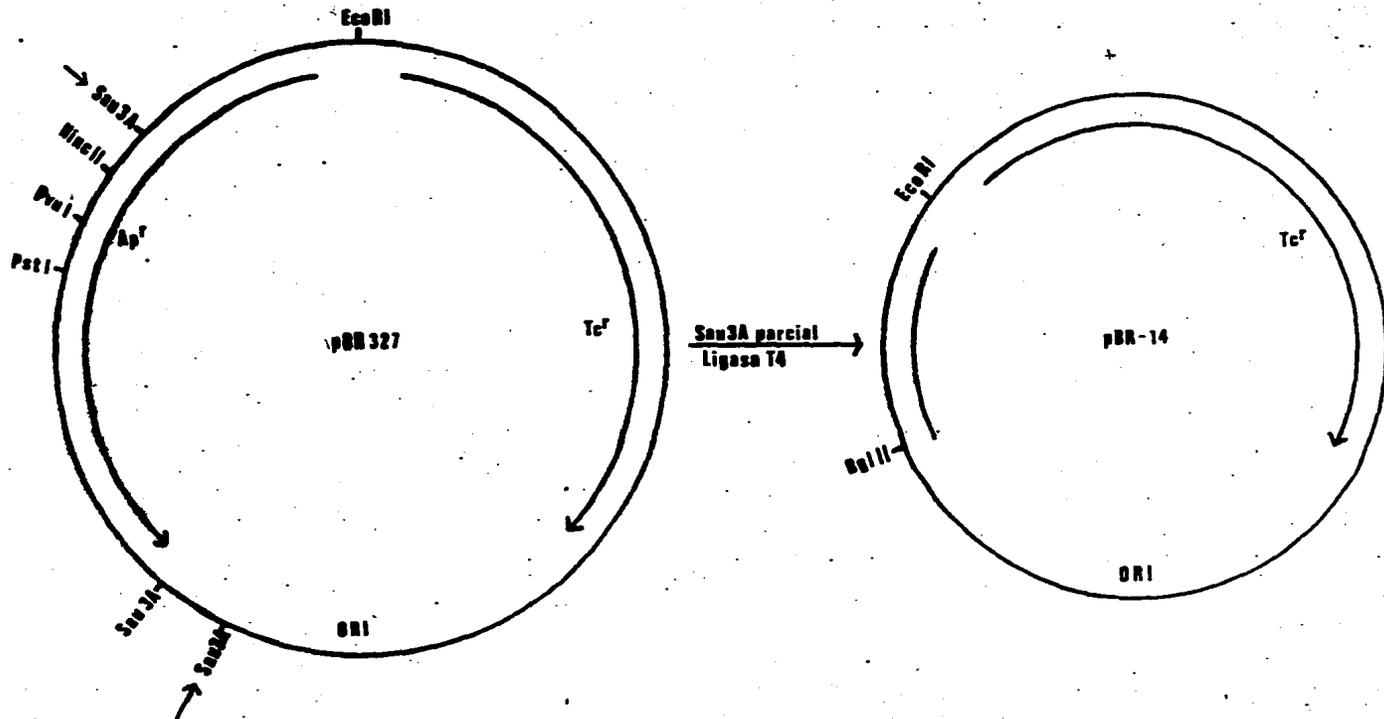


FIGURA 6

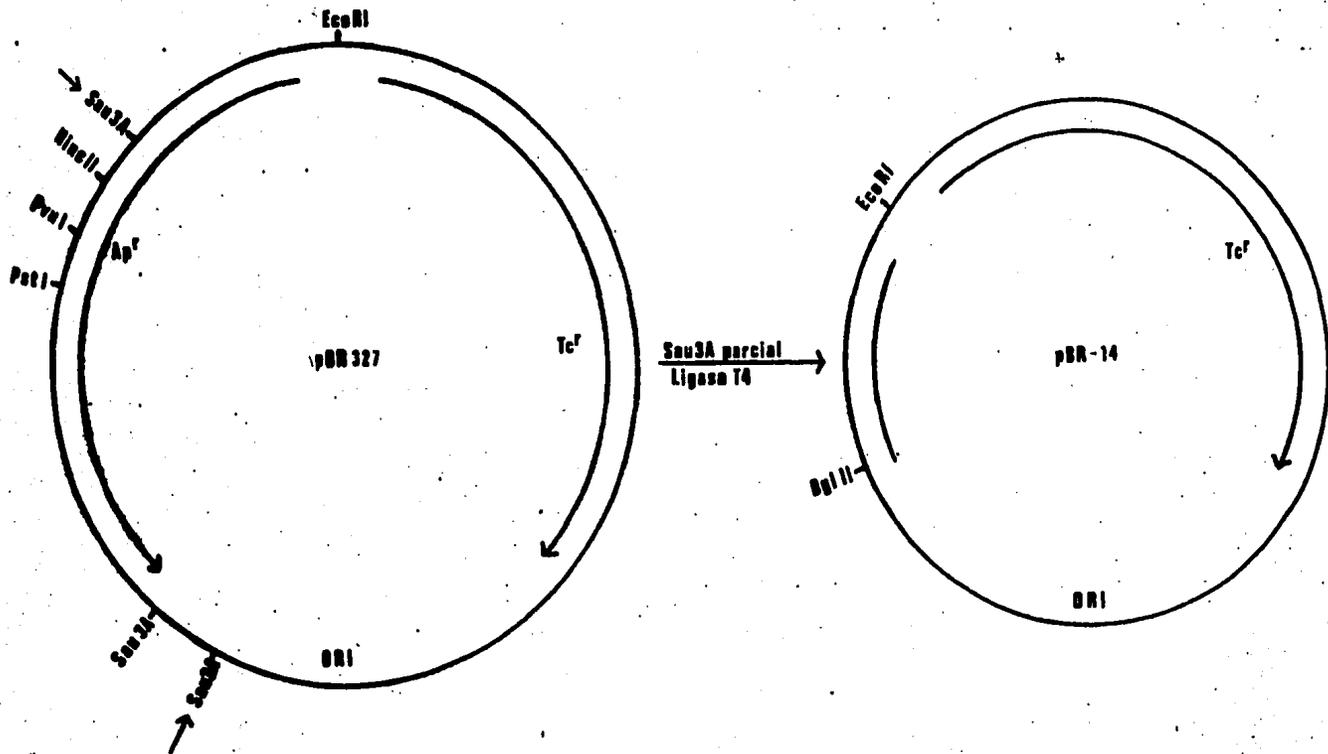


FIGURA 6

las de otros plásmidos tales como el CloDF13, ColE1, pMB9, etc y observamos que la región mencionada es conservada en todos estos plásmidos.

Posteriormente, se intentó hacer una inserción de un oligonucleótido sintético en el sitio de BglII del pBR-14. Este experimento no logró hacerse directamente en pBR-14, aunque se lograría posteriormente, después de insertar otro origen de replicación en este plásmido (ver resultados).

Por todos los anteriores argumentos, pensamos que la secuencia descrita tenía algún efecto en la replicación del plásmido que, o bien era esencial para la viabilidad del plásmido o, no permitía el aislamiento de plásmidos que carecieran de ella en las condiciones normales de selección. Esta sugerencia resultaba interesante puesto que ninguno de los reportes publicados en relación a plásmidos tipo ColE1 ha considerado la posibilidad de que una secuencia arriba del promotor del primero tenga alguna función en el inicio de la replicación, aunque ciertamente se ha reportado la existencia de un sitio de terminación localizado entre las posiciones -20 y -50 con respecto al inicio de la transcripción del "primero" tanto para el plásmido CloDF13 (Stuitje et al, 1981) como para el plásmido pBR322 (von Gabain et al, 1983). Este terminador hubiera sido escindido al efectuarse la delección originalmente planeada (de -44 a -129). Se ha propuesto que su función es la de detener la transcripción que viene de regiones hacia arriba del origen con el fin de evitar que se dispare el número de copias de tal forma que pueda ser letal para la célula. Un caso como este ha sido reportado para el plásmido CloDF13, en el cual ocurre la expresión de un gene anterior al origen en forma muy intensa. Se ha visto que mutaciones que impiden la terminación en el terminador mencionado, son letales para la célula (Stuitje et al, 1981). Sin embargo en el caso del pBR327, el gene que precede al origen y se transcribe en la misma dirección (β -lactamasa), tiene su propio terminador y además no se transcribe con tanta fuerza como lo hace el gene que precede al origen de CloDF13 y por lo tanto no consideramos que el terminador situado en la región previa al origen resulte esencial para el pBR, ni que puedan explicarse las observaciones ya

señaladas por la posible pérdida del terminador mencionado. De cualquier forma, cabe agregar que en el pBR-14, la estructura que corresponde a dicho terminador es restituida, aunque pierde estabilidad, ya que para regenerarse da lugar a una protuberancia ("bulge"). La figura 7 facilita la comprensión de esta idea. Creemos que es muy probable que esta estructura siga siendo funcional como terminador en el pBR-14.

Considerando el lugar donde radica la secuencia posiblemente involucrada en la replicación, nos pareció que sería probable que ejerciera su efecto a través de afectar el funcionamiento del promotor del RNAlI. Por otra parte, al analizar las condiciones particulares bajo las cuales opera el promotor del RNAlI, esta idea se hacía muy significativa. Tales condiciones son:

1- El promotor del RNAlI inicia la transcripción de un transcrito que procede en dirección opuesta al del RNAl, siendo el promotor del RNAl mucho mas fuerte que el primero (5 veces, in vitro). Se ha visto que cuando ocurre una transcripción convergente, cada uno de los transcritos involucrados influye sobre la transcripción de su opuesto causando una disminución (Ward et al, 1979). En estos casos, la transcripción mas afectada es la que proviene del promotor mas debil. P.ej. para el caso de los promotores trp y PL en λ , la transcripción del primero es totalmente bloqueada por la transcripción a partir de PL, cuando este último se está expresando con una fuerza 10 veces mayor que la de trp.

2- El RNA II es un RNA muy largo, no es traducido y tiene la posibilidad de formar muchas estructuras secundarias alternativas, ya que en esto se basa la formación de un híbrido adecuado para el reconocimiento de la RNAsaH. Como se explicó en la introducción, la síntesis total de un mRNA requiere del acoplamiento de la transcripción y traducción, dado que la RNA polimerasa es pausada por la presencia de estructuras secundarias y esto en ocasiones conduce a la terminación prematura de un transcrito. De esta forma se ha visto que un RNA estructurado que no es traducido, como es el caso de los RNAs ribosomales y tRNAs, tienen requerimientos adicionales que en algunas ocasiones radican en secuencias hacia arriba de su promotor (Lamond et al, 1983). y en

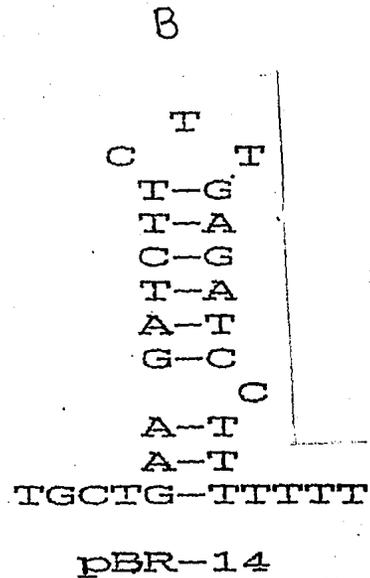
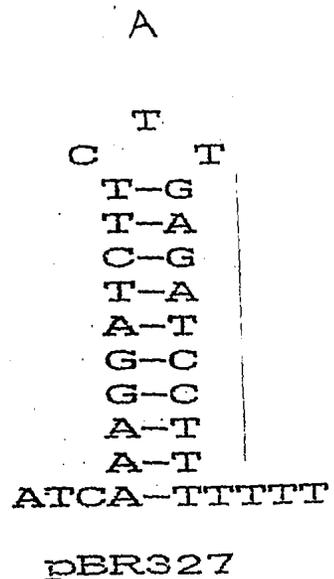


Figura 7. a) terminador presente entre las posiciones -48 y -21 con respecto al inicio de la transcripción del RNAII, en el plásmido pBR327 y b) estructura palindrómica que lo sustituiría en el pBR-14 en la misma posición, probablemente funcional como terminador.

otros consiste en la implementación de mecanismos específicos de antiterminación para lograr una transcripción eficiente (Holben et al, 1985).

3- El transcrito del RNA II se encuentra en su camino con un terminador aproximadamente 40 p.b. después del punto en que inicia (Stuber et al, 1981). Se cree que este terminador evita el paso de transcritos que vienen desde arriba del RNA II y que pudieran elevar el número de copias. No obstante lo anterior, los transcritos salientes del promotor del RNA II no parecen ser afectados significativamente por este terminador, lo cual sugiere que pudiera existir un mecanismo específico para evitar su terminación.

Todos los antecedentes y consideraciones antes descritos nos sugirieron que había una región regulatoria hacia arriba del origen que posiblemente estaba involucrada en el control del número de copias. Dado que esto no había sido descrito anteriormente para plásmidos tipo ColE1 y ya que en general nos interesa el conocimiento de los factores involucrados en el mecanismo de replicación de este tipo de plásmidos, consideramos importante el definir la participación de la región mencionada en las funciones del plásmido. Así mismo lo anterior resultaba esencial para el objetivo de regular el número de copias del pBR327. Por tales motivos se propuso como objetivo para la presente tesis el siguiente:

Determinar si una región hacia arriba del promotor del "primero" de replicación del plásmido pBR327, situada entre las posiciones -44 y -129, se requiere para que éste se transcriba optimamente y estudiar sus efectos sobre la replicación y el número de copias de dicho plásmido. Un objetivo secundario que se lograría con este trabajo era la obtención de construcciones necesarias para la obtención de un vector de clonación cuyo número de copias pueda regularse.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plásmidos. Las cepas de E.coli K12 y los plásmidos usados en este trabajo se describen en la siguiente tabla:

Designación	Características relevantes	Referencia
Cepas		
RR1	F , proA2, leuB6, thi-1, lacY1 rspL20, hsdSrb mb .	Bolivar et al. (1977)
JM101	((lac, pro) thi, strA, endA, sbcB15, supE, F'traD36, proA, lacIq)	Messing et al. (1981)
(polA ts)	polA ts (polimerasa I de DNA temperatura sensible)	Gomez-Eichelmann (1981)
N100	(gal E T K , recA , lac , pro)	Adhya et al (1976)
Plásmidos		
pBR327	Ap ^r ; Tc ^r ;	Soberón et al (1980)
pACYC184	Cm ^r ; Tc ^r ;	Chang et al. (1978)
pK01	Ap ^r .	Rosenberg et al (1983)
pSC101	Tc ^r ;	Cohen et al (1983)
pBR-14	Tc ^r ;	Este trabajo
pBR-15	Cm ^r ; Tc ^r	Este trabajo
pBR-18	Cm ^r ; Tc ^r	Este trabajo
pBR-18b	Cm ^r ; Tc ^r	Este trabajo
pBR-15b	Cm ^r ; Tc ^r	Este trabajo
pH1	Ap ^r	Este trabajo
pB2	Ap ^r	Este trabajo
pB3	Ap ^r	Este trabajo

Medios, reactivos y enzimas. Como medio de cultivo se utilizó el medio Luria. Para las cepas que contenían el pK01 o sus derivados se utilizó Agar McConkey (Difco). El medio sólido se hizo con bacto-agar Difco. Los antibióticos (Sigma) se añadieron a las concentraciones siguientes: Ap 100 ug/ml; Cm 40 ug/ml; Tc 30 ug/ml. Los nucleótidos se adquirieron de P.L. Biochemicals; el (- p) dATP, 400 ci/mmol, se compró de Amersham International y los oligonucleótidos sintéticos se prepararon por el método del fosfotriéster en soporte sólido descrito por Ito et al. (1982).

Las enzimas de restricción se compraron de P.L. Biochemicals y New England Biolabs. La ligasa de T4 se purificó de acuerdo al procedimiento descrito por Panet et al. (1973). La DNA polimerasa I (fragmento Klenow) se adquirió de Boeringher Mannheim y la nucleasa de S1 se compró de Amersham International. La polinucleótido cinasa de T4 fue adquirida de Bio-Labs. Las digestiones de DNA de plásmido se llevaron a cabo según las condiciones sugeridas por New England Bio-labs.

Electroforesis en geles de agarosa y acrilamida. Las condiciones para electroforesis han sido descritas por Bolivar et al (1977) y fueron utilizadas sin modificaciones.

Los geles fueron teñidos con Bromuro de etidio (sigma) utilizado en solución (4mg/ml) y se visualizaron con una lampara de UV de onda corta.

Para fotografiar los geles se usó un filtro de gelatina amarilla No.9 Kodak Wratten y película Polaroid NP tipo SS con una cámara MP-5 Polaroid.

Los fragmentos fueron eluidos de geles de agarosa o acrilamida como describe Maniatis et al. (1982).

Construcción y caracterización de plásmidos recombinantes. Para la construcción de todos los plásmidos se utilizaron técnicas "standard" de DNA recombinante, esencialmente en la forma en que se describen en el manual de Maniatis et al. (1982). La caracterización de las recombinantes se llevó a cabo buscando patrones de restricción en minipreparaciones de plásmido. Algunas veces la detección de las recombinantes se hizo mediante

hibridación en colonia de acuerdo al método que describen Grunstein y Hogness (1975).

Fosforilación y marcaje radioactivo de oligonucleotidos. El producto oligonucleotídico de una síntesis química no está fosforilado en su extremo 5'. La fosforilación se llevó a cabo con ATP radioactivo (para seguir al oligo), adicionando 50 uCi de [γ -P]ATP a una mezcla de polinucleotido cinasa, con 20-40 pmolas del oligonucleotido. Después de 30 min., se adicionaron 10 nmoles de ATP frío y se incubo durante 10 minutos.

Transformación. Las células de E.coli de la cepa RR1 y N100 fueron preparadas para la transformación por el método decrito por Cohen et al (1972) y optimizado por Hanahann (1984). No se hizo ninguna modificación a estos métodos.

Preparación de DNA de plásmido. La extracción y purificación de plásmido, cuando eran requeridas pequeñas cantidades se hizo de acuerdo al método de lisis alcalina reportado por Birnboim y Doly, (1979) y modificado por Ish Horowicz para minipreparaciones de plásmido.

Cuando se requirieron cantidades grandes se utilizó el método de lisado claro de Betlach. et al. (1976). En este caso el DNA fue preparado de cultivos celulares crecidos a fase logarítmica y amplificados por la adición de 300 ug/ml de sulfato de espectinomicina.

Determinación de secuencia. Las determinaciones de secuencia nucleotídica se hicieron utilizando el método de "terminadores dideoxy" reportado por Sanger (1979) después de la correspondiente subclonación en vectores de M13 (Messing et al. 1981).

Determinaciones de número de copias. El número de copias de los plásmidos fue determinado de acuerdo al método descrito por Mosser y Campbell (1983), con algunas modificaciones. La cepa de E.coli RR1 conteniendo el plásmido cuyo número de copias se quisiera determinar, fue crecida en 100 ml de medio luria con 10 ug/ml de

tetraciclina hasta una densidad óptica de 0.5 a 0.6 O.D. a 550 nm. Después de diluir los cultivos a una densidad óptica de 0.5, 80 ml de cada cultivo fué mezclado con una cantidad igual de un cultivo igualmente diluido de RR1 conteniendo el plásmido pACYC184, como un control interno. El pACY184 tiene un número de copias de 18 por cromosoma (Chang et al. 1978). Las células se lisaron por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979), y el DNA fué linearizado con HindIII para eliminar las formas multiméricas. Las cantidades relativas de DNA de plásmido se cuantificaron por análisis densitométrico de fotografías de los geles en un espectrofotómetro Beckmann modelo DU-8.

Determinación de actividad de galactokinasa. Se llevaron a cabo determinaciones de actividad de galK de las clonas conteniendo los plásmidos pK01, pH1, pB2 y pB3 con el fin de conocer la actividad del promotor del RNA II en todas estas construcciones.

El método que se utilizó para el ensayo de galactokinasa fué derivado y modificado por Rosenberg (1981) a partir de los reportes de Wilson et al, y Adhya et al, (1979). Consiste en lo siguiente: Las células conteniendo el plásmido pK01 o un derivado de éste, se crecen a fase logarítmica (O.D.650 = 0.6) en medio M56 con fructuosa como fuente de carbono. Llegado este punto, se transfiere una alícuota de 1 ml a un tubo eppendorf y se le adicionan 40 ul de buffer de lisis (100 mM EDTA; 100 mM DTT; 50 mM Tris pH8) y unas cuantas gotas de tolueno. Las muestras son vigorosamente agitadas y posteriormente colocadas en un agitador de 37C para facilitar la evaporación del tolueno. En este momento las células están listas para iniciar el ensayo.

Se adicionan 20 ul de muestra a 80 ul de mezcla de reacción conteniendo lo siguiente:

20 ul de mezcla 1 (DTT 5mM; NaF 16mM)

50 ul de mezcla 2 (MgCl₂ 8mM; Tris pH9 200mM; ATP 3.2 mM)

10 ul de C¹⁴-galactosa (20 uM)

Se incuba lo anterior por 15-30 min a 32C, se toman 50 ul y se colocan en un filtro DE81 de 2.5 cm de diámetro, se lava con agua hasta que una muestra blanco contenga menos de 1000 cpm. Las unidades de galactokinasa se expresan como nanomoles de galactosa

fosforilada por min por ml de células a OD (650nm) = 1.0.

Después de que el ensayo se termina, se toman 25 ul de dos muestras seleccionadas al azar y se transfieren a dos filtros adicionales. Estos dos filtros no son lavados. Todos los filtros son secados con una pistola de aire y se cuentan con 5 ml de econofluor.

Para calcular las unidades de galactokinasa, se utilizó la siguiente fórmula. Esta asume que una eficiencia de conteo de 40% para carbono-14 y que han sido utilizados 20 ul de alicuota para el ensayo:

$$\frac{\text{galactokinasa} = (\text{cpm-blanco}) \times 5200}{(\text{unidades}) \quad \text{cuentas promedio de} \quad \times \quad \text{tiempo} \quad \times \quad \text{OD}(650)}$$

filtros no lavados de incubacion

Se utilizó D-(1-¹⁴C) galactosa Amersham a 50 μ Ci por μ mol. La galactosa marcada se diluye a una actividad específica final de 4.5×10^6 dpm/ μ mol.

RESULTADOS.

Como se verá a lo largo de esta sección, el desarrollo del proyecto estuvo caracterizado por una serie de imprevistos que dificultaron la interpretación de algunos de los experimentos. Muchos de los problemas que se presentaron fueron consecuencia de la complicada actividad transcripcional de los plásmidos pBR que fueron usados para el trabajo, (al respecto de ésta, se presenta una descripción en la figura 9). Sin embargo, el uso de estos plásmidos estaba justificado, por un lado porque el fenómeno de interés fue encontrado en ellos y por otro lado, porque eran los que queríamos manipular para su regulación.

Esta será una narración cronológica del trabajo. Para facilitar su comprensión se mencionará aquí que lo que esta tesis demuestra es que una región inmediatamente arriba del promotor del RNAII, afecta positivamente la transcripción de éste y por lo tanto, el número de copias del plásmido. Evidencias menos contundentes sugieren que el elemento relevante es la secuencia que se regeneró en la construcción del pBR-14, a la cual ya me referí en la sección de antecedentes.

En la siguiente presentación las posiciones de bases se referirán al sitio de iniciación de la transcripción del RNAII, así mismo, el promotor del RNAII será referido como RNAIIp.

A. Construcciones de plásmidos.

La primera estrategia obvia que se utilizó para el estudio de la región inmediatamente arriba del RNAIIp consistió en alterar la secuencia hacia arriba de -44 y evaluar sus efectos a través del número de copias y estabilidad del plásmido. El plásmido en el que se llevarán a cabo tales alteraciones tenía que cumplir con algunos requisitos de acuerdo a las suposiciones que entonces se manejaban. Estos requisitos eran: que hubiera un sitio único de restricción en la región que nos interesaba estudiar que permitiera introducir mutaciones; que el plásmido que fuera a sufrir tales mutaciones garantizara el poder ser aislado aunque su origen de replicación perdiera su funcionalidad totalmente y; que la característica fenotípica que fuera a usarse para la selección de las mutantes permitiera el aislamiento de plásmidos de alto o

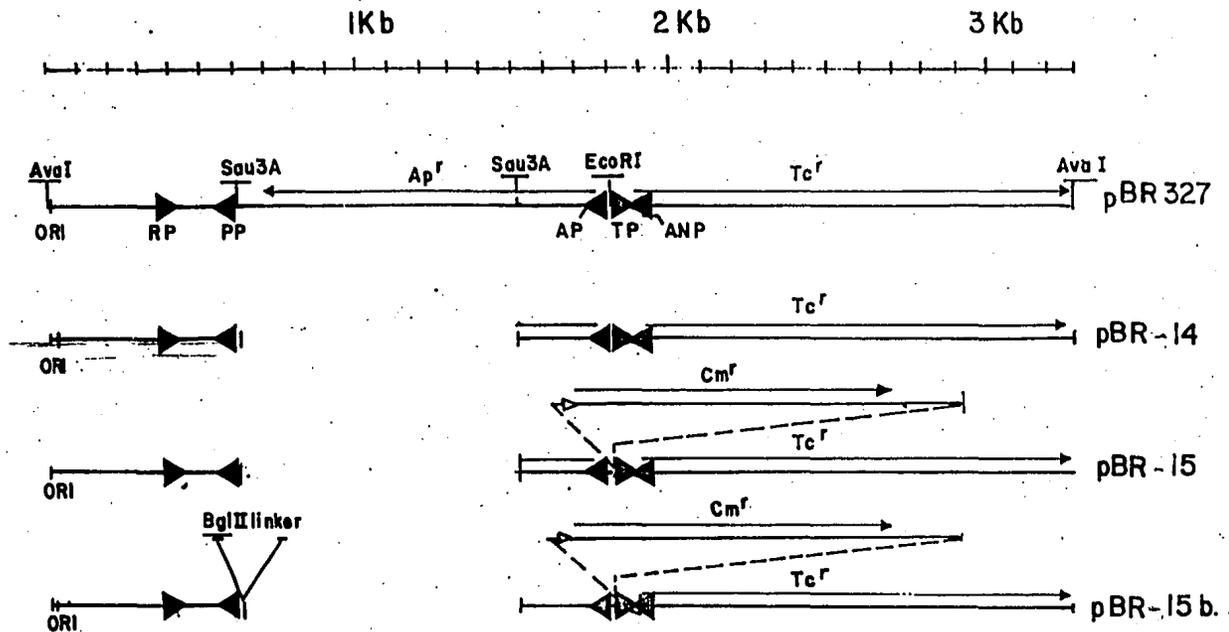
bajo número de copias con igual probabilidad.

El plásmido pBR327 no cumplía con tales requisitos especialmente porque no tenía un sitio único de restricción en la región que nos interesaba. El pBR-14, en cambio tenía un sitio único de restricción para BglIII en la posición -44 que resultaba muy apropiado para introducir alteraciones de la secuencia, y por tal motivo se decidió utilizarlo. Sin embargo, este plásmido como tal no era el más adecuado para buscar efectos de replicación, ya que al haber sido generado por una delección que se llevó parte del gen de resistencia a ampicilina, sólo es seleccionable como tet^r. La resistencia a tetraciclina es en general débil y pensamos por ello que al seleccionar para tet^r pudiera estarse seleccionando indirectamente a aquellos plásmidos que presentaran un alto número de copias. Por otro lado, el pBR-14 tampoco permitiría el aislamiento de un plásmido en el cual el origen de replicación hubiera perdido su funcionalidad.

Con la intención de solucionar estos inconvenientes, se procedió a hacer dos construcciones. La primera de ellas consistió en insertar un "casette" que confiere resistencia a cloranfenicol en el sitio de EcoRI del pBR-14. El plásmido resultante, denominado pBR-15, es tal que el gen de resistencia a cloranfenicol se lee en el mismo sentido que el de tetraciclina, es decir en sentido contrario al origen.

Para contender con la posibilidad de perder la viabilidad del plásmido al alterar su secuencia hacia arriba de -44, se decidió proveer al pBR-15 de otro origen de replicación. El origen que se eligió fue el del plásmido pSC101 por las siguientes razones: el plásmido pSC101 tiene un mecanismo de replicación muy distinto al de los plásmidos tipo ColE1, lo cual los hace compatibles (Collins, 1977); existían antecedentes en los cuales estos dos orígenes se había incluido en el mismo replicón (Cabello et al, 1976) y; en una condición polA en donde el origen tipo ColE1 no es funcional, el origen de pSC101 si lo es, mientras que en una condición polA+ esta situación se invierte. Tal circunstancia nos permitiría hacer experimentos en forma diferencial.

El origen de pSC101 fue obtenido como un fragmento de HindIII y fue clonado en el sitio de HindIII del plásmido pBR-15. La



PP Promotor del Primero.
 RP Promotor del RNA I.
 AP Promotor de Ampicilina.
 TP Promotor de Tetraciclina.
 ANP Promotor Antitet.

Fig. 8

presencia del origen de pSC101 se seleccionó por conferir replicabilidad en condiciones polA. Como esperábamos el plásmido resultante, llamado pBR-18, se comportó como un plásmido de alto número de copias en condiciones polA+ indicando que el origen de pBR estaba activo.

El plásmido pBR-18 tenía ya todas las características necesarias para analizar la región hacia arriba de -44, es decir, contaba con un origen de replicación adicional, que permitiría aislar mutantes cuya replicabilidad dependiente del origen de pBR hubiera sido impedida y tenía el gene que confiere resistencia a cloranfenicol, cuya expresión permite la selección de plásmidos monocopia. En este plásmido se procedió a alterar la región de -44. Para ello se linealizó con BglII y se recircularizó en presencia de un 18mero sintético cuya secuencia de bases era **GATCTCCC666A** y que proveía un sitio de SmaI a través del cual se podían identificar las clonas que lo contenían. La transformación se recuperó en condiciones polA. Se seleccionaron algunos plásmidos con sitio de SmaI y otros sin éste. Posteriormente se observó que en condiciones polA+ las bacterias cuyos plásmidos tenían sitio de SmaI, producían parches más pequeños que las otras cuando el medio contenía altos niveles de cloranfenicol. Se escogió uno de los plásmidos que tenían la inserción del oligonucleótido y se le denominó pBR18-b.

El hecho de que el plásmido pBR18b presentara menor resistencia a cloranfenicol podía explicarse a través de dos hipótesis alternativas, una de ellas era que la alteración de la secuencia hacia arriba de -44 hubiera obligado a estos plásmidos a depender del origen de pSC101, que es de bajo número de copias, y la otra era que dicha alteración hubiera tenido como consecuencia una disminución considerable en el número de copias conferido por el origen de pBR. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se decidió quitar el origen de pSC101 del pBR-18b. El plásmido resultante, el pBR-15b, es equivalente al pBR-15 excepto porque contiene la inserción descrita en la posición -44. Su existencia demostró que el origen de pSC101 era prescindible en el pBR-18b y por ende que la alteración en la región de -44 no es letal para un plásmido tipo pBR. Sin embargo la menor resistencia a

cloranfenicol indicaba que el origen no funcionaba optimamente. Cuando cabía la posibilidad de que modificaciones en la región de -44 fuesen letales, manejábamos dos hipótesis opuestas: que el origen no funcionara o que lo hiciera a tan alto nivel que interfiriera con el funcionamiento de la célula huésped. Con la construcción del pBR-15b fue posible descartar la segunda hipótesis.

B. Determinación de número de copias de los plásmidos pBR327, pBR-14, pBR-15 y pBR15-b.

A través de los experimentos descritos en la anterior sección, se obtuvo la mutante deseada (pBR15b) para la observación del efecto de la región hacia arriba de -44, sobre el origen de replicación. Se decidió entonces hacer determinaciones del número de copias y estabilidad de las construcciones mencionadas. Para este fin se utilizaron los procedimientos que se indican en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos en este experimento se presentan en la tabla número 2. Como puede observarse hay marcadas diferencias en los números de copias de todos los plásmidos. No obstante, como resultará claro más adelante, algunas de estas diferencias son debidas a efectos transcripcionales provenientes de otras regiones del plásmido no relacionadas con el origen de replicación pero que se transcriben sobre éste generando "primeros" útiles para iniciar replicación. Independientemente de estos efectos que serán discutidos más adelante, existe una clara diferencia entre los plásmidos pBR-15 y pBR-15b, los cuales deben presentar la misma actividad transcripcional proveniente de regiones hacia arriba del origen, ya que su única diferencia es la alteración que se presenta en -44.

Antes de adentrarse en la explicación de los resultados obtenidos, conviene hacer referencia a la figura 9 y a la tabla 1, en donde se señalan los sitios de terminación e inicio de transcripción que se han determinado en el plásmido pBR327, y se expresan las fuerzas de los promotores y el grado de terminación que se da en los puntos señalados. Así mismo en la figura 9 se muestran cuales terminadores y promotores se vieron afectados en

DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS

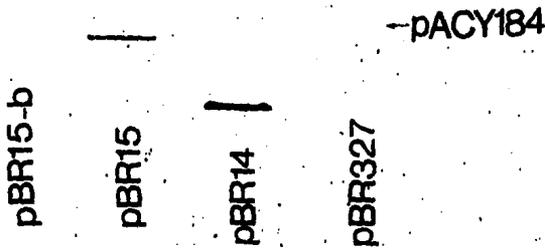


TABLA 2

DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS

PLAMIDO	COPIAS/CROMOSOMA
pACY184	18
pBR327	30
pBR-14	60
pBR-15	45
pBR-15b	15

TABLA 1

Señales transcripcionales en pBR322

Pro motor	Mapeado en la posición	Dirección de la transcripción	Función del transcrito	Sitios de terminación	Longitud del transcrito resultante (nt)	Observaciones sobre terminación	Referencias
P1	80-40	opuesta	B-lactamasa (Ap)	~3210(t1) ~3110(t2) ~3070(t3)	~1245 ~1345 ~1400	La terminación de bla es casi completa en estos sitios	Stuber & Bujard (1981); Brosius et al. (1982); Von Gabain et al. (1983)
P2	5-45	igual	gene Tc	alrededor 650 dentro de Tc ^r región (t6)	630 y otros	La terminación en este sitio se observa solo in vitro.	Boyer et al. (1977); Stuber & Bujard (1981).
P3	4225-4190	opuesta	B-lactamasa (Ap)	~3210(t1) ~3110(t2) ~3070(t3)	~ 980 ~1080 ~1140	-	Stuber & Bujard (1981); Von Gabain et al. (1982) Brosius et al. (1982).
P _p	3123-3098	opuesta	Primero de replicación (RNA II)	-	555	Un transcrito de 555 nt se obtiene por la acción de la RNasa H.	Itoh & Tomizawa (1980); Tomizawa et al (1981).
P4	2970-2995	igual	RNA I	3100(t4)	108	La terminación es eficiente pero no total en este punto.	Itoh & Tomizawa (1980); Tomizawa et al (1981); Stuber & Bujard (1981).
P5	alrededor de 3150	igual	No se conoce	alrededor 2700(t5)	550	-	Stuber & Bujard (1981).
P _{op}	2310-2270	opuesta	No se conoce	-	-	-	Queen & Rosenberg (1981)

En dirección de transcripción, opuesta significa, en contra de las manecillas del reloj e igual significa en el mismo sentido.
bla = β-lactamasa.

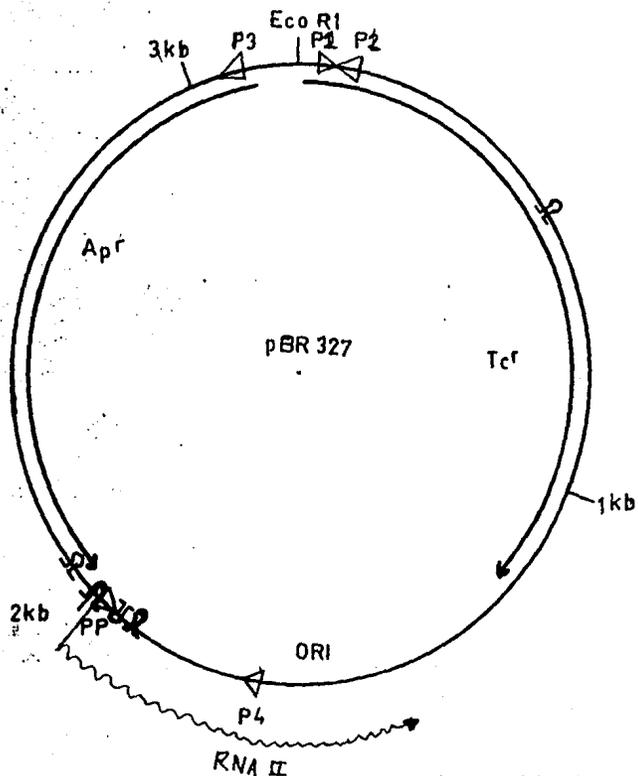


FIGURA 9. SEÑALES DE INICIO Y TERMINACION DE LA TRANSCRIPCIÓN EN PBR327 Un promotor se señala con el símbolo Δ , la dirección es indicada por el mismo símbolo. Un terminator se señala con el símbolo Ω . Los transcritos que

de secuencia a partir de -44. Los promotores de los plásmidos pBR-14, pBR-15 y pBR-15b fueron secuenciados comprobándose que no habían sufrido ninguna mutación.

Debe notarse que el pBR-15b tiene menor número de copias que el pBR327 y aunque una comparación directa entre estos dos plásmidos no es del todo válida, resulta significativo este hecho, puesto que la presencia de un sitio de terminación adicional justamente antes del promotor del RNAII en el pBR327, haría suponer que en éste ocurre menor actividad transcripcional sobre el origen proveniente de otros promotores y esto conduce nuevamente a la conclusión de que el pBR-15b presenta alteraciones funcionales de su replicación atribuibles a la secuencia ya señalada.

Los resultados de estabilidad son consistentes con las variaciones en el número de copias.

C. Construcciones en pK01

La dificultad para interpretar directamente los datos obtenidos a través de los anteriores experimentos, hizo clara la necesidad de aislar transcripcionalmente el origen de replicación. Para ello hubiera sido necesario insertar algunos terminadores fuertes en la región inmediatamente hacia arriba del RNAIIP. No obstante no contábamos con sitios de restricción adecuados en todos los casos que permitieran hacer dicha inserción. Por esa razón decidimos alternativamente aislar el promotor del RNAII y estudiar su funcionamiento en otro contexto, es decir dirigiendo la transcripción del gene de galactokinasa presente en el plásmido pK01.

El plásmido pK01 fue diseñado específicamente para el estudio de promotores (McKenney et al, 1981) in vivo y para tal fin cuenta con el gene de galactokinasa, el cual carece de promotor y en su lugar existen diversos sitios únicos de restricción (McKenney et al, 1981). Adicionalmente en la región hacia arriba de tales sitios, se insertó un terminador fuerte que aísla transcripcionalmente al gene galK. En este sistema se inserta el promotor que desee estudiarse en cualquiera de los sitios de restricción mencionados y se observa su fuerza como una función de

la actividad de galactokinasa, la cual puede medirse en un ensayo relativamente sencillo.

De esta forma, fueron insertados en pK01 paralelamente tres diferentes fragmentos provenientes de los plásmidos pBR327 y pBR-14. Uno de ellos, aislado como un fragmento de HpaII de 404 pares de bases del pBR327 contenía la secuencia hacia arriba de -44 originalmente presente en el pBR327, además del promotor del RNAII, este plásmido se llamo pB1. Otras características estructurales contenidas en este fragmento se presentan en la figura 11. El otro fragmento, producto de la digestión doble BglII-HpaII, contenía igualmente el promotor del RNAII, pero el sitio de BglII delimitaba la posición -44, de tal forma que no tenía la secuencia del pBR327 a partir de este punto. A este plásmido se le denominó pB2.

Un tercer fragmento aislado del pBR-14 como consecuencia de cortar con BglIII-HaeIII, contenía tanto el promotor del RNAII como el del RNAI, si bien el inserto quedó orientado de tal forma que el promotor del RNAII dirigía la transcripción de galactokinasa. En esta construcción también fue alterada la secuencia a partir de -44 hacia arriba. Este plásmido fue denominado pB3. Un mapa de los plásmidos descritos se presenta en la figura 11.

Las construcciones hechas en pK01 fueron transformadas en una cepa galK y pudieron seleccionarse en placas de McConkey-galactosa, en donde aquellas bacterias que no expresan galactokinasa, como sería el caso de las que portan el plásmido pK01 sin promotor, forman colonias blancas y aquellas que están expresando galactokinasa, es decir las que tienen promotor, forman colonias rojas.

Vale la pena mencionar que se hicieron otras construcciones, todas las cuales estaban delimitadas hacia arriba y hacia abajo por los mismos sitios de restricción. Estas construcciones contenían el promotor del RNAII en todos los casos pero algunas tenían mutaciones hacia arriba de -44 introducidas con un oligonucleótido sintético. En tales plásmidos, se observó en forma superficial la actividad de galK, según la intensidad del color de las colonias que formaban en McConkey y se encontró que había consistencia con la idea de que la expresión de galK se ve

FIGURA 11

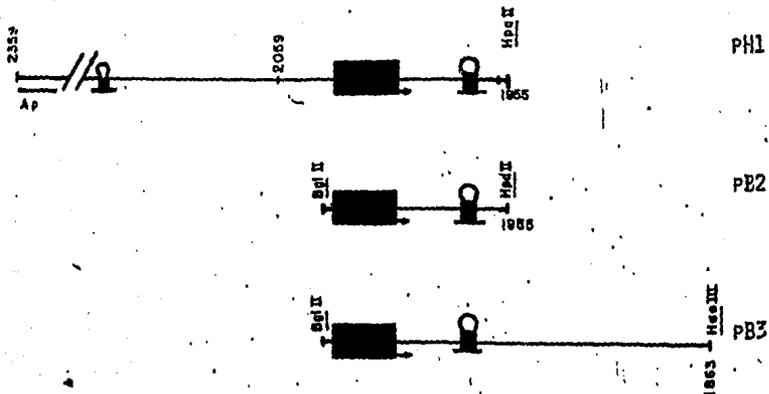


TABLA 3

PLASMIDO	ACTIVIDAD EN UNIDADES POR UG DE PROTEINA/MINUTO.
PKO 1	1.3
PH1	334
PB2	90.2
PB3	54.5

ACTIVIDADES DE GALACTOKINASA DE LAS DIFERENTES CLONAS EN PLASMIDO PKO1.

DISCUSION

Este trabajo demuestra esencialmente que variaciones en la secuencia hacia arriba de -44 del promotor del RNA II, tienen efectos en la transcripción de este RNA. Nuestra evidencia mas clara al respecto proviene de comparar las actividades de galactokinasa de las colonias que contienen los plásmidos H1 y B2. El plásmido H1 conserva la secuencia hacia arriba de -44 igual a la del pBR327 y el plásmido B2 contiene una secuencia diferente a partir de esta misma posición (la cual es aportada por el pK01). La actividad de galactokinasa que presenta el pH1 es tres veces superior a la del pB2.

Una segunda conclusión que deriva de las construcciones en pK01 se observa a través de la actividad de galactokinasa conferida por el plásmido pB3 (ver resultados). En este plásmido la secuencia hacia arriba de -44 también ha sido alterada y por otra parte, refleja mejor las condiciones en las que se expresa el RNAIIp in vivo, ya que incluye el promotor del RNA I transcribiéndose en forma opuesta al RNAII, de igual manera que como ocurre en el origen de replicación. El hecho de que el pB3 presente actividad de galactokinasa demuestra que la transcripción del RNAII no es totalmente dependiente de la secuencia hacia arriba de -44.

Los plásmidos pBR-15 y pBR-15b cuyo número de copias fue determinado, confirman la funcionalidad de una secuencia hacia arriba de -44, dada la diferencia de sus números de copia y además sugieren que en el pBR-15 se restituye en un cierto grado la función que ejerce tal secuencia en el plásmido pBR327. Si esto es así, las características de secuencia que el pBR-15 (o pBR-14) tiene en común con el pBR327 en su región de -44 hacia arriba, podrían sugerir una cierta caracterización de la secuencia involucrada en la función descrita. En este sentido, la región que resulta mas homóloga entre los plásmidos mencionados se localiza entre las posiciones -49 y -56, en donde ambos presentan la secuencia AAAAGAT solo desfasada por una base. Es importante recordar que el pBR-14 fue el único plásmido con variaciones en la región hacia arriba de -44, que pudo aislarse durante el

experimento de delección que se describió en la sección de antecedentes.

Otra característica notable respecto a la secuencia que circunda la zona de -44 es que es muy rica en A/T, situación que prevalece en el pBR-14 y que es alterada en los plásmidos pBR-15b y pB2. La relevancia de esto será discutida mas adelante.

Una observación que puede ser de utilidad para la delimitación de la región que afecta al promotor en su extremo mas distal, es que en el plásmido pBR327 la secuencia proveniente del origen de replicación del pMB9 incluye hasta la posición -59, hacia arriba de la cual se inicia la secuencia correspondiente al gene de ampicilina (Sutcliffe, 1979). Esto indicaría que la zona de influencia sobre el RNAIIp no se extiende mas allá de la posición mencionada. Lo anterior no es demostrado directamente e incluso podría pensarse que regiones propias del gene de ampicilina fueran responsables circunstancialmente del efecto observado. Al respecto, puede argumentarse que las señales involucradas en el inicio, regulación y terminación de la transcripción del gene de ampicilina han sido estudiadas y se encuentran bien localizadas en el plásmido pBR322 y sus derivados (von Gabain et al, 1983; Stuber et al, 1981). Por esta razón se puede afirmar que en la región de ampicilina que se incluye en el plásmido H1 no existe ningun elemento que pueda explicar la activación de la transcripción del RNAII.

Con el fin de explorar la posibilidad de que la secuencia hacia arriba de -44 pueda ser definida como parte del promotor o bien como un elemento regulatorio, se presenta a continuación un análisis de la estructura del RNAIIp y se recuerdan las condiciones en las que normalmente se expresa.

El promotor del RNAII tiene un -35 (TTGAGA) y un -10 (TANNNT) casi canónicos, la distancia entre estos es de 17 p.b.. Su actividad medida in vitro lo define como un promotor de fuerza media. Estas características no sugieren la necesidad de extender la estructura del promotor para un funcionamiento óptimo. Por otra parte, se mencionaron anteriormente algunas evidencias de que la transcripción de un RNA es afectada in vivo por la expresión

opuesta de otro RNA, cuando uno de ellos se transcribe con mayor fuerza. La expresión del RNA I y el RNA II ocurre en forma análoga, siendo el RNA II el que se expresa con menor fuerza. Aunque no se ha demostrado que la transcripción del RNA II se vea afectada por la transcripción del RNA I, una situación de este tipo sí justificaría la necesidad de una secuencia que aumentara la fuerza del RNA IIp.

Otras consideraciones pertinentes en relación a esta idea incluyen las evidencias que Travers ha presentado con respecto a secuencias hacia arriba de -35 que afectan el funcionamiento de un promotor (Lamond et al, 1983). Estas evidencias no han definido un consenso en cuanto a posición o en cuanto a secuencia. Una característica interesante que presentan muchos de los promotores en los que Travers ha definido requerimientos hacia arriba es que son promotores que inician transcripción de operones de tRNAs o RNAs ribosomales. Los transcritos de estos operones, como ya se dijo antes, son muy estructurados y no son traducidos, circunstancia que los predispone a sufrir cierta polaridad (ver introducción). Esta situación se presenta también en el caso del RNA II y permite sugerir que los promotores que originan RNAs no traducibles pudieran haber desarrollado un requerimiento de este tipo, con el fin de aumentar el inicio de su transcripción.

Otro dato que ha sido propuesto por H. Bujard en relación a la extensión de la estructura de un promotor ha sido ya comentado en la introducción y se refiere a la presencia de una región rica en A/T en la vecindad del promotor (Deuschle et al, 1986). Con respecto a esto ya se ha mencionado que el plásmido pBR327 tiene una región de alto contenido de A/T alrededor del promotor del RNA II; específicamente, en la región que abarca las posiciones de -35 a -55, su contenido es de un 70%. En el pBR-14 la región que incluye las posiciones mencionadas contiene también un alto contenido de A/T (72%). Sin embargo, en el pBR-15b en la región que va de -35 a -55 hay un 30% de bases A/T, es decir se vuelve fundamentalmente rica en G/C y en la clonación hecha en pK01, (pB2), también se ve disminuido su contenido de A/T (42%). Todo lo anterior sugeriría que es la composición de bases en la vecindad del promotor la que determina su funcionamiento óptimo.

Sea este el caso o sea que participa una secuencia específica (de entre las cuales la más significativa es AAAAGAT), consideramos que existen razones que explican la presencia de un requerimiento estructural hacia arriba del promotor para su funcionamiento óptimo.

Estas razones están principalmente relacionadas con las características del transcrito que se produce y con las condiciones en que éste se sintetiza.

El análisis anterior considera la posibilidad de que haya un elemento cercano al promotor, que bien podría ser definido como parte de él y que constitutivamente activa su inicio, pero existe también la posibilidad de que la secuencia hacia arriba del promotor sea una señal independiente que participa en la regulación de la transcripción a través de interaccionar con otra molécula efectora tal como una proteína. La regulación del inicio de la transcripción del "primero" tendría como consecuencia variaciones en el número de copias. Estas variaciones podrían reflejar una coordinación entre el "ciclo de vida" del plásmido y las condiciones metabólicas de su huésped. No obstante, a la luz de los resultados que aquí se presentan, no es posible analizar tal hipótesis, aunque cabe señalar que durante la amplificación, donde no hay replicación del cromosoma bacteriano, ocurre replicación de plásmido, lo cual no sería totalmente consistente con la sugerencia anterior. De cualquier forma, si el caso del RNAI_p fuera este, la proteína que interaccionaría con su secuencia hacia arriba de -44, sería codificada por el cromosoma bacteriano, puesto que las únicas proteínas que son codificadas por el pBR327 son aquellas que le confieren resistencia a un antibiótico, (β -lactamasa y tet).

Otro aspecto regulatorio que debe ser considerado en este contexto, se refiere a la regulación de la terminación, cuyas características generales han sido delineadas en la Introducción. Para ello debe recordarse que a lo largo del origen ocurre la formación de diversas estructuras secundarias en las cuales podría esperarse que haya pausamiento de la RNA-polimerasa, aborción o incluso terminación en presencia de rho. De hecho se ha determinado la presencia de un terminador 40 p.b. después del

inicio de la transcripción del RNAIIP.

Esta situación sugiere que podría existir un mecanismo que asegure la transcripción eficiente por encima de las estructuras mencionadas, es decir, que impida la terminación. El proceso de antiterminación fue descrito ya, en el inicio de este trabajo, se mencionó entonces que se ha encontrado un caso en E. coli, en el cual se ha demostrado que un promotor puede conferir a la RNA-polimerasa capacidad de transcribir por encima de terminadores rho dependientes. Lo anterior fue reportado por Holben et al (1985) para el operón ribosomal rrnC. Este autor define la antiterminación como un evento simple de disminución de la eficiencia de terminación y no como un mecanismo específico de regulación transcripcional. Se ha propuesto, en forma especulativa, que la antiterminación causada por los promotores de rrnC podría ser consecuencia de una interacción poco usual de la RNA polimerasa permitida por la estructura del promotor. Bajo este mismo concepto podría suponerse que el promotor del RNAIIP y la secuencia que lo circunda podrían ejercer la función de antiterminador como un mecanismo sustitutivo del acoplamiento de la traducción y la transcripción. Ciertamente los plásmidos pHI y pB2 no incluyen las secuencias que dan lugar a la mayoría de las estructuras que se forman a lo largo del RNA II, sin embargo la anterior hipótesis sigue siendo válida y las diferencias de actividad de galK podrían ser explicadas en función de ella, ya que el terminador situado en el interior del origen si está presente en estas construcciones.

En este sentido, consideramos digno de señalarse que entre las secuencias hacia arriba de P1P2 de rrnC y RNAIIP hay homologías significativas y vuelve a ser sobresaliente el alto contenido de A/T que se encuentra en la región; característica que es además compartida con los otros promotores de operones ribosomales. A continuación se alinean las secuencias que se encuentran hacia arriba de los promotores mencionados con el fin de destacar las características señaladas.

RNAIIP AGAAAAGATC AAAGGATCTTCTTGAGA
rrnC AGAAAATTATTTAAATTCCTC TTGTCA

Por otra parte, debe mencionarse que la estructura en tandem de los promotores de operones ribosomales, parece ser importante para explicar el comportamiento particular de la transcripción en estos operones.

Finalmente, a manera de conclusión, me gustaría señalar que, en función de las analogías que aquí se presentan, lo que a nuestro parecer es la hipótesis más fundamentada respecto a la definición y función de la secuencia hacia arriba de -44 que activa la transcripción del RNAII es que, debido a que es un promotor que transcribe un RNA estable y no traducido, tiene un requerimiento adicional similar a los que se presentan en otros promotores de este tipo. Este requerimiento se manifiesta como una extensión del promotor que bien puede actuar haciendo posible una interacción distinta entre la RNA polimerasa y el templado ya sea para aumentar la frecuencia del inicio de la transcripción, o bien para causar una mayor eficiencia de transcripción a lo largo del templado, por disminuir la probabilidad de terminación. No puede excluirse la posibilidad de que lo anterior se lleve a cabo con la participación de alguna proteína efectora cuyos requerimientos de reconocimiento sean mínimos y no muy evidentes a través de la secuencia. Experimentos que ayudarían a evaluar esta última posibilidad involucrarían transcripciones in vitro, utilizando templados del RNAII y su promotor, que hacia arriba representarían distintas deleciones hasta -35 y hacia abajo incluyeran las estructuras secundarias que se forman en este transcrito.

Por otra parte, para descartar la hipótesis de que la secuencia hacia arriba de -44, está directamente involucrada en la regulación del inicio de la replicación podría efectuarse un estudio en donde se midiera el número de copias de bacterias (de E. coli) con distintas velocidades de duplicación de su población; y en función de diferentes condiciones metabólicas y posteriormente observar las variaciones de este comportamiento al alterar la secuencia mencionada.

RESUMEN

La replicación del plásmido pBR322 y sus derivados procede mediante un mecanismo tipo ColE1, cuyos elementos claves son dos moléculas de RNA: el RNAII, que funciona como primero para la replicación y el RNAI que es un inhibidor de la replicación, ya que al ser capaz de formar un híbrido con el RNAII, impide que este último actúe como primero.

A través de ciertos experimentos hechos en el laboratorio se encontraron evidencias de que una secuencia ubicada hacia arriba del promotor del RNAII (entre la posición -44* y -55), tenía efectos sobre el control de la replicación del plásmido pBR327. Como un primer enfoque para probar esta hipótesis se construyeron 4 plásmidos llamados pBR-15, pBR15b, pBR-18 y pBR-18b en los cuales se harían determinaciones de número de copia y de esta manera se obtendría información acerca de su capacidad de replicación. Estos plásmidos presentaban diferencias de secuencia con respecto al pBR322 y sus derivados, en la región que precede al promotor del RNAII, a partir de la posición -44 hacia arriba.

La figura 8 ilustra los plásmidos mencionados y a continuación se hace una breve historia de ellos a través de la cual se aprecian sus características distintivas.

- El pBR-14, un plásmido cuya construcción se describe con detalle en la sección de antecedentes, fué utilizado para la construcción del pBR-15 y a partir de éste último derivaron a su vez los plásmidos pBR-18, pBR-18b y pBR-15b en forma sucesiva. El pBR-14 era el plásmido mas adecuado para estos experimentos porque presenta un sitio único para la enzima BglII, situado muy cerca del promotor del RNA II (en -44), característica que lo distingue de pBR327 y pBR322. Por otra parte, aunque el pBR-14 también presenta ciertas diferencias de secuencia en la región que nos interesaba estudiar (entre -44 y -55), conserva aquellas que parecen ser importantes para el efecto observado en la replicación.

* La posición indicada se refiere en todos los casos al sitio donde inicia la transcripción el RNAII.

- El pBR15 se obtuvo después de insertar el gen de clovanfenicol en el sitio de EcoRI del plásmido pBR-14.

- El pBR-18 es producto de insertar el origen de replicación del plásmido pSC101, en el sitio de HindIII que se localiza dentro del gen de resistencia a tetraciclina del plásmido pBR-15.

- En el sitio de BglIII del plásmido pBR-18 se introdujo un oligonucleótido sintético. De esta manera se modificó la secuencia presente a partir de la posición -44, por la inserción de 32 p.b.. Al plásmido resultante se le denominó pBR-18b.

- El plásmido pBR-15b se obtuvo por delección del origen de pSC101 al cortar el pBR-18b con la enzima HindIII. El pBR-15b es equivalente al pBR-15 excepto por la modificación de secuencia que se introdujo en el sitio de BglIII.

La construcción del pBR-18 y pBR-18b fue necesaria para garantizar metodológicamente la obtención de dos plásmidos, cuya única diferencia fuera la secuencia ubicada inmediatamente hacia arriba de -44. En relación a lo anterior debe mencionarse que inicialmente había la suposición de que el pBR-15b como tal no fuera viable debido a que la alteración de secuencia causada a partir de -44, podría impedir totalmente el funcionamiento del origen. Si éste hubiera sido el caso, la presencia del origen de pSC101 en el pBR-18b hubiera asegurado la replicación y aislamiento de este plásmido. Sin embargo el pBR-15b pudo obtenerse, si bien, como se describe mas adelante, presentando una replicación mas deficiente.

En los plásmidos pBR-15, pBR-15b, pBR327 y pBR-14 se llevaron a cabo determinaciones de número de copia, obteniéndose que había diferencias importantes entre ellos. Los resultados se presentan en la tabla 2 y se discuten ampliamente en el texto. La disminución en el número de copias que presenta el pBR-15b (15 copias por célula) con respecto al pBR-15 (45 copias por célula) fue consistente con la hipótesis de que una secuencia hacia arriba de -44 afecta la replicación de los plásmidos pBR.

Como una segunda alternativa para probar la hipótesis ya

mencionada y con el fin de explorar si el efecto observado ocurría a través de una regulación de la transcripción del RNA II, se procedió a hacer algunas inserciones de fragmentos que contenían el promotor del RNA II, dentro del sitio de SmaI del plásmido pK01 (probador de promotores). Estas inserciones condujeron a la obtención de los plásmidos pH1 y pB2, entre otros. Las características relevantes de estos plásmidos son:

- El plásmido pH1 contiene el promotor del RNAII y la secuencia que lo precede en el pBR327 (hasta más arriba de -55).
- El plásmido pB2 contiene el promotor del RNAII. Sin embargo, a partir de la posición -44 contiene una secuencia diferente (la cual es aportada por el pK01).

En los plásmidos pH1 y pB2 se hicieron determinaciones de actividad de galactokinasa (que en este caso variaría únicamente en función de la actividad del promotor) y se encontró que el plásmido pH1 presentaba una actividad tres veces mayor a la del pB2.

Este resultado demostró claramente que una región inmediatamente arriba del promotor del RNAII, activa su transcripción y esto tiene consecuencias sobre la replicación y el número de copias de los plásmidos pBR.

En la sección de discusión que presenta esta tesis se hace un análisis detallado acerca de la delimitación de la secuencia involucrada en el efecto descrito y así mismo, se discuten las circunstancias que explicarían la activación observada.

BIBLIOGRAFIA

Avery, O., McLeod, C., McCarthy, M.J.; Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types *Experimental Medicine*, 79:137. (1944).

Balbás, P., Soberón, X., Merino, E., Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N., Bolivar, F.; Gene. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives: a review. *Gene*, 50:3-40. (1987).

Betlach, M.C., Hershfield V., Chow, L., Goodman, H. M., Boyer, H. W.; A restriction endonuclease analysis of bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA. *Fed. Proc.* 35:2037. (1976).

Birnboim, H. C., Doly, J.; A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1515. (1979).

Botchan, P. Electron-microscopic comparison of transcription on linear end superhelical DNA. *J. Mol. Biol.* 105:161. (1976).

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W.; Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 2:95. (1977).

Brosius, J., Cate, R.L., Perlmutter, A.P.; Precise location of two promoters for the -lactamase gene of pBR322. *J. Biol. Chem.* 257:9205. (1982).

Bujard, H., Niemann, A., Brenning, K., Roisch, U., Dresel, A., et al. In Promoters: Structure and Function, ed. R.L.Rodriguez, M.J. Chamberlin, pp.121-140. New York: Praeger. 524 pp. (1982).

Cabello, F., Timmis, K., Cohen, S.N.; Replication control in a composite plasmid constructed by in vitro linkage of two distinct replicons. *Nature*. 259:285. (1976).

Chang, A.C.Y., Cohen, S. N.; Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from p15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134:1141. (1978).

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., Helling, R. B.; Construction of a biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:3240. (1973).

Cohen, S. N., Chang, A.C.Y., Hsu, C. L.; Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:2110. (1972).

Collins, J.; Current Topics in Microbiology and Immunology. 78:121. (1977).

Conrad, S. E., Campbell, J. L.; Role of Plasmid-Coded RNA and Ribonuclease III in Plasmid DNA Replication. *Cell.* 18:61. (1979).

Crick, F.H.C.; *Nature* 227:561. Central dogma of molecular biology. (1970).

Davidson, J.; Mechanism of control of DNA replication and incompatibility in ColE1-type plasmids - a review. *Gene.* 28:11. (1984).

Danchin, A., Ullmann, A.; The coordinate expression of polycistronic operons in bacteria. *TIBS*, Feb. 1980:51. (1980).

Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R., Bujard, H.; Promoters of Escherichia coli: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. *EMBO.* 5:2987. (1986).

Drumond, M., Clements, J., Merrick, M., Dixon, R.; Positive control and autogenous regulation of the nifLA promoter in Klebsiella pneumoniae. *Nature* 301:302. (1983).

Gellert, M.; DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 50:879. (1981).

Goldberger, R.F.; Biological Regulation and Development. Plenus Press. N.Y. (1979).

Greenblatt, J.; Regulation of transcription termination by the N

gene protein of bacteriophage lambda. Cell. 24:8. (1981).

Grunstein, M., Hogness, D.S.; Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 72:3961. (1975).

Hanzhan, D.; Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol., 166:557. (1983).

Hawley, D. K., McClure, W. R.; Compilation and analysis of Escherichia coli promoter DNA sequences. Nucl. Acids. Res. 11:2237. (1983).

a Helinski, D. R. et al edition.; Plasmids in Bacteria. Volume 30. Basic Life Sciences. Plenum Press. N.Y. and London. pp 119. (1985).

Hershey, A.D., Chase, M.; Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol. 26:36. (1952).

Kornberg, A. J.B.C. 233:163. (1958).

Holben, W. E., Prasad, S. M., Morgan, E.; Antitermination by both the promoter and the leader regions of an Escherichia coli ribosomal RNA operon. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:5073. (1985).

Ito, H., Ike, Y., Ikuta, S., Itakura, K.; Solid phase synthesis of polynucleotides. VI. Further studies on polystyrene copolymers for the solid support. Nucl. Acids. Res. 10:1755. (1982).

Itoh, T., Tomizawa, J.; Formation of a RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:2450. (1980).

Itoh, T., Tomizawa, J.; Purification of ribonuclease H as a factor required for initiation of in vitro ColE1 DNA replication. Nucl. Acids. Res. 10:5949. (1982).

Lacatena, R. M. and Cesareni, G. Interaction between RNAI and the primer precursor in the regulation of ColE1 replication. J. Mol. Biol. 170:635. (1982).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Lamond, A.I., Travers, A.A.; Requirement for an upstream element for optimal transcription of a bacterial tRNA gene. *Nature*. 305:248. (1983).

Lee, N.; The operon. Cold Spring Harbor Lab. 449 pp. (1976).

Lewin, B.; Gene Expression: Bacterial Genomes. Ed. Wiley & Sons. G.B. pp 430. (1974).

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.; Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. (1982).

Masukata, H. and Tomizawa; Effects of point mutations on formation and structure of the RNA primer for ColE1 replication. *J. Cell*. 36:513. (1984).

McClure, W.R., Hawley, D.K., Malan, T. P. (ver ref Bujard). The mechanism of RNA polymerase activation on the P and lacP promoters. pp. 111-20. (1982).

McKenney, K., Shimatake, H., Court, D., Schmeissner, U., Brady, C., Rosenberg, M. A system to study promoter and termination signals recognized by Escherichia coli RNA-polymerase. in Gene Amplification and Analysis. Vol 2. edited by Chirikjian, J. & Papas, T. S.; Elsevier/North-Holland. 594 pp. (1981).

Malan, T. P., Kolb, A., Buc, H., McClure, W. R.; Mechanism of CRP-cAMP activation of lac operon transcription initiation activation of the P1 promoter. *J. Mol. Biol.* 180:881. (1984).

Mandecki, W., Caruthers, M. H.; Mutants of the large promoter with large insertions and deletions between the CAP binding site and the -35 region. *Gene*. 31:263. (1984).

Maquat, L. E., Thornton, K., Reznikoff, W.; lac Promoter mutations located downstream from the transcription start site. *J. Mol. Biol.* 139:537. (1980).

Meacock, P. A., Cohen, S. N.; Partitioning of bacterial plasmids during cell division: A cis acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell*. 20:529. (1980).

- Menzel, R., Gellert, M.; Regulation of the genes for E.coli DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. Cell. 34:105. (1983).
- Messing, J., Crea, R., Seeburg, P.; A system for shotgun DNA sequencing. Nucl. Acids. Res. 9:309. (1981).
- Morgan, E. A.; Antitermination mechanisms in rRNA operons of Escherichia coli. J. Bacteriol. 168:1. (1986).
- Morita, M., Oka, A.; The structure of a transcriptional unit on colicin E1 plasmid. Eur. J. Biochem. 97:535. (1979).
- Moser, D. R., Campbell, J.; Characterization and complementation of pMB1 copy number mutant. Effect of RNAI dosage on plasmid copy number and incompatibility. J. Bacteriol. 154:809. (1983).
- Mulligan, M. E., Hawley, D. K., Entriken, R., McClure, W. R.; Escherichia coli promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity. Nucleic Acids Res. 12:789. (1984).
- Okasaki, T., Okasaki, R.; In vivo mechanism of DNA chain growth. C.S.H.O.B. 33:129. (1968).
- Panet, A., Van de Sande, J.H., Joewen, P.C., Khovanc, H.G., Rave, A.J., Lillehan, J.R., Kleppe, K.; Physical characterization and simultaneous purification of bacteriophage T4 induced kinase polynucleotide ligase and deoxyribonucleic acid polymerase. Biochemistry. 12:5045. (1975).
- Platt, T.; Transcription termination and the regulation of gene expression. Ann. Rev. Biochem. 55:339. (1986).
- Reznikoff, W. S., Siegele, D. A., Cowing, D. W., Gross, C. A.; The regulation of transcription initiation in bacteria. Ann. Rev. Genet. 19:355. (1985).
- Sanger, F., Air, G., Barrell, B., Brown, L., Coulson, A., Fiddes, J., Hutchinson, C., Slocombe, P. & Smith, M.; Nature, 265:687. (1977).
- Sanzey, B.; Modulation of gene expression by drugs affecting

deoxyribonucleic acid gyrase. *J. Bacteriol.* 138:40. (1979).

Selzer, G., Som, T., Itoh, T. y Tomizawa, J.; The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids. *Cell.* 32:119. (1983).

Schimtz, A.; Cyclic AMP receptor protein interacts with lactose operator DNA. *Nucleic Acids Res.* 9:277. (1981).

Schwartz, J., Beckwith, J. R.; The Lactose Operon. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. 437 pp. Mutants missing a factor necessary for the expression of catabolite-sensitive operons in E. coli (1970).

Siebenlist, U., Simpson, R. B., Gilbert, W.; E.coli RNA polymerase interacts homologously with two different promoters. *Cell.* 20:269. (1980).

Soberón, X., Covarrubias, L., Bólvivar, F.; Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene.* 9:287. (1981).

Som, T y Tomizawa, J.; Replication origin of plasmid RSF1030. *Mol. Gen.* 182:375. (1982).

Stuber, D., Bujard, H.; Organization of transcriptional signals in plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:167. (1981).

Stuitje, A. R.; Identification of mutations affecting replication control of plasmid CloDF13. *Nature*, 290:264. (1981).

Suplement to DNA replication. A. Kornberg. Freeman. W.H.and Company. (1982).

Sutcliffe, G.; Complete nucleotide sequence of the E.coli plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77. (1979).

Tamm. and Polisky.; Structural analysis of RNA molecules involved in plasmid copy number control. *Nucl. Acids. Res.* 11:6381. (1983).

Tomizawa, J.; Origin of replication of colicinE1 plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:1865. (1977).

- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G. and Som, T.; Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:1421. (1981).
- Tomizawa, J., Itoh, T.; Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNAI with primer transcript. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:6096. (1981).
- Tomizawa, J. and Itoh, T.; The importance of RNA secondary structure in ColE1 primer formation. Cell. 31:575.
- Tomizawa, J.; Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNAI to the primer transcript. Cell. 38:861. (1984).
- Tomizawa, J. and Som, T.; Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNAI to the primer transcript by the Rom protein. Cell. 38:871. (1984).
- von Gabain, A., Belasco, J.G., Schottel, J.L., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N.; Decay of mRNA in Escherichia coli: investigation of the fate of specific segments of transcripts. Proc. Natl. Acad. Sci. 60:653. (1963).
- Ward, D.F., Murray, N.; Convergent transcription in bacteriophage λ : Interference with gene expression. J. Bacteriol. 133:249. (1979).
- Watson, J.D., Crick, F.H.C.; A structure for DNA. Nature. 171:736. (1953)
- Watson, J.D., Crick, F.H.C.; Genetic implications of the structure of DNA. Nature. 171:964.
- Watson, J.D.; Molecular Biology of the Gene. Third edition., W.A. Benjamin, Inc., U.S.A. (1977).
- Wong, E. M. and Polisky, B. Alternative conformations of the ColE1 replication primer modulate its interaction with RNAI. Cell. 42:959. (1985).
- Youderian, P., Bouvier, S., Susskind, M. M.; Sequence determinants of promoter activity. Cell. 30:843. (1982).

Yu, X. M., Reznikoff, W. S.; Deletion analysis of RNA polymerase interaction sites in the E. coli lactose operon regulatory region. J. Mol. Biol. (1965).