



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



**UN SISTEMA EXPERIMENTAL PARA EL AISLAMIENTO DEL SUSTRATO MINIMO DE  
REPLICACION EN PLASMIDOS TIPO ColE1**

**TESIS**

**que para obtener el título de Licenciado en  
Investigación Biomédica Básica**

**presenta**

**Jorge Armando Cruz Reyes**

**ASESOR**

**Dr. Xavier Soberón Mainero**





## **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

I.-	INTRODUCCION	1
I.1.-	Aspectos generales sobre la replicación	1
I.2.-	Aspectos particulares de la replicación de plásmidos tipo ColE1	6
II.-	DEFINICION DEL PROBLEMA	11
III.-	SISTEMA EXPERIMENTAL	13
IV.-	MATERIAL Y METODOS	15
V.-	RESULTADOS	22
V.1.-	Caracterización de una cepa de E.coli polA <sup>ts</sup> (temperatura sensible).	22
V.2.-	Construcción del plásmido pBS4	23
V.3.-	Construcción del plásmido pBS43	25
V.4.-	Estrategias experimentales para producir deleciones unidireccionales.	26
VI.-	DISCUSION	31
VII.-	BIBLIOGRAFIA	36

## I - INTRODUCCION

### I.1-Aspectos generales sobre la replicacion

La transferencia del material hereditario de un organismo a su progenie, se basa en la duplicación del ácido nucleico para luego proceder con la transmisión de una copia y con ella la información genética que contiene (1,2). Dicho acervo genético, ya en el interior de un organismo y en condiciones biológicas adecuadas se hace manifiesto (fenotipo) mediante los flujos de información contemplados en el Dogma Central de la Biología Molecular(3), el cual básicamente señala que la expresión de la información genética se da en el sentido ácidos nucleicos → proteínas y nunca al contrario.

Aun cuando entre los organismos es posible observar genomas de ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA), tanto cadena sencilla como doble, y aunque sus mecanismos de duplicación puede diferir ampliamente, todos sin excepción operan con base en la especificidad de apareamiento de bases: adenina con timina (uracilo) y guanina con citocina. Este hecho esencial fue primeramente propuesto por Watson y Crick en 1953 al postular el modelo de la doble hélice y el modo semiconservativo de replicación del DNA (4,5).

NOTA: El postulado de la doble hélice de DNA, fue básicamente el producto del trabajo realizado en el laboratorio Cavendish de Cambridge y el King's College de Londres por R.M.Franklin (6), H.H.Wilkins (7), J.D.Watson y F.H.C.Crick. La equivalencia de bases observada por Chargaff en el fue un antecedente crucial(8).

El mecanismo semiconservativo de replicación fue demostrado por los experimentos de Matthew Meselson y Franklin Stahl(9), los cuales permitieron distinguir las cadenas parentales de las hijas.

Posteriormente, estudios bioquímicos de la biosíntesis tanto de nucleótidos como de coenzimas empezaron a elucidar los eventos esenciales del proceso biosintético, tal como la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo 3' en el extremo creciente de una cadena de DNA, llamado "primero" y el grupo fosfato 5' del deoxinucleótido (dNTP) entrante, se dice por ello que el sentido de la biosíntesis es 5' → 3' (5'' a 3'). Después fue descubierto que la elongación de la cadena es catalizada por enzimas denominadas polimerasas de DNA dirigidas por DNA (10) y que se han encontrado en extractos de todas las células bacterianas, vegetales y animales donde la síntesis de DNA se ha medido. Estas enzimas (igualmente RNA polimerasa dirigida por DNA y DNA polimerasa dirigida por RNA) son las únicas entre las enzimas que para elegir y procesar su sustrato requieren de una molécula templado, además de que su mecanismo enzimático de elongación no requiere reconocer una secuencia específica de bases .

Es importante enfatizar el papel angular del templado en la elongación del DNA en dos aspectos: 1.- como una estructura sobre la que se aparea otra molécula de ácidos nucleicos que aporta el extremo 3', es decir, el "primero". En ausencia del primero ninguna polimerasa de DNA conocida puede iniciar una nueva cadena; 2.- Como una secuencia de bases sobre las que es adicionado selectivamente cada dNTP por el principio de la complementariedad, es decir, un templado en el sentido estricto.

En E.coli las enzimas encargadas de polimerizar DNA, mejor descritas,

son la polimerasa I o de Kornberg , y las polimerasas II y III.

Los primeros análisis del proceso de replicación, esencialmente autorradiográficos, indicaban que la orquilla de replicación del cromosoma de E.coli, se extendía en un solo sentido, sin embargo esto no parecía congruente con la dirección de replicación, 5' a 3', y la anticomplementaridad de la doble hélice. Para resolver esta paradoja, se han propuesto modelos replicativos que predicen en la región de la orquilla, un espacio transitorio de cadena sencilla sobre un lado del duplex, 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 (11) 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. Sin embargo, la concurrencia observada en la replicación de las dos hélices del cromosoma de E.coli, se ha explicado en un esquema propuesto recientemente. Este contempla la replicación simultanea de ambas cadenas, en pequeños trechos del DNA, sin dejar de considerar el rezago en una de las cadenas producido por la semidiscontinuidad (fig 1). El esquema, sugiere la participación de una polimerasa dimerica, asociada a un conjunto de proteínas replicativas denominado "primosoma" y a una o mas proteínas helicicas, todo reunido en una estructura hipotética, denominada replisoma"(28). La polimerasa III ha sido relacionada con el primosoma, ya que es dimerica y tiene un sitio activo en cada subunidad. Igualmente se ha asociado a este conjunto de proteínas, la proteína dnaB, llamada "primasa", ya que puede sintetizar un "primero" de DNA. La apertura del duplex durante la replicación podría resultar de la acción de helicicas como la

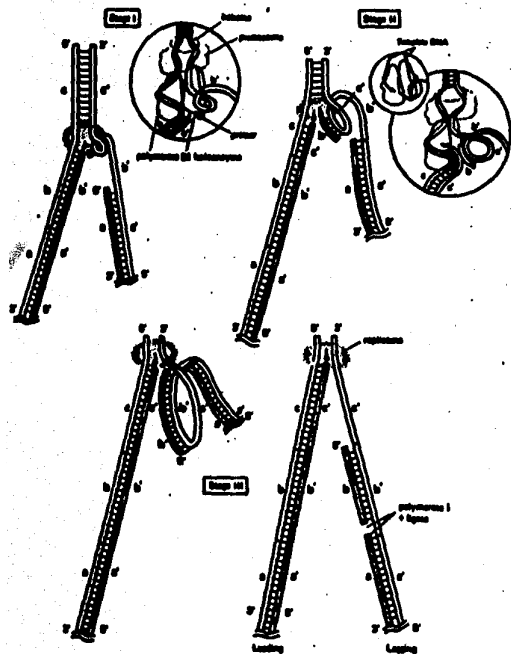


Fig 1. Mecanismo propuesto para la replicación concurrente de las cadenas guía y retardada por una polimerasa dimérica asociada con el primasa y una o dos helicasas en un replicón. Stage I, en la cadena -guía la replicación está siempre más avanzada, por lo que las regiones replicadas simultáneamente se son complementarias. Stage II, al plegar la cadena retardada 180° se logra la misma orientación 3' a 5', de la cadena guía en la orquilla. Stage III, el primero producido por el primasa se asocia con la polimerasa, al paso del primasa sobre la cadena retardada. Al avanzar la síntesis al extremo 3' del fragmento anterior, la cadena retardada se libera. El replicón volverá a empezar. Fig.-tomado de la ref. 20

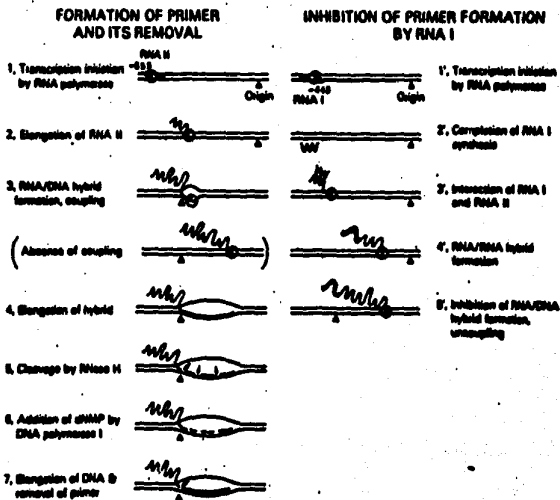


Fig 2. Ilustración esquemática de la formación del primero y su inhibición por RNA I. Una ampliación de cada proceso se presenta en la figura y en la Introducción. Paso 3, consiste de dos procesos alternativos: el proceso abortivo está entre paréntesis. Las líneas rectas representan las dos cadenas del DNA; líneas onduladas, transcritos de RNA; y círculos pequeños, RNA polimerasa. El complejo de RNA forma una estructura de "ojo" desde el origen de replicación de DNA (indicado por ) mientras el DNA hibridado se se elonga. Las flechas en la estructura del "ojo" en el paso 3 indican el corte en el RNA hibridado por la RNase H. Una flecha más gruesa indica el sitio preferido de corte (Sells y Tombara, 1982). Una línea gruesa en el "ojo" en los pasos 6 y 7 se une a una nueva cadena sintetizada de DNA. Los transcritos del RNA II que forman un híbrido con el complejo de DNA cerca del origen, proveen una estructura que puede ser procesada por la RNase H, de tal manera que produce un primero para el inicio de la replicación (sitio específico). La interacción entre el RNA I y el RNA II evita la formación del híbrido RNA-DNA, y con ello la participación de la RNase H y de la polimerasa I en la zona del origen. Fig.-tomado de la ref. 20

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 en lista 15 proteínas asociadas a replicación (alrededor de 30 polipéptidos), y bien podrían ser descubiertos componentes adicionales del primosoma, helicasas y subunidades de la polimerasa III.

En una gran cantidad de estudios sobre mecanismos que controlan la replicación del DNA incluyendo el que trata esta tesis, los plásmidos, han ofrecido un modelo muy atractivo. Estas moléculas son elementos genéticos extracromosómicos presentes en una variedad de especies bacterianas, hongos y algunos eucariotes. Consisten comúnmente en moléculas circulares cerradas de doble cadena y de tamaños que van de 1 a más de 200 kilobases, esto ha permitido una gran facilidad de manipulación en el laboratorio y de hecho en algunos casos ha sido posible su replicación in vitro. Por otro lado, muchos de los plásmidos pueden ser seguidos durante un crecimiento bacteriano ya que codifican para enzimas que bajo ciertas circunstancias son ventajosas para el huésped bacteriano y funcionan como marcadores de selección.

En la mayoría de los casos la replicación del DNA plasmídico hace uso del conjunto de enzimas utilizadas para duplicar el cromosoma huésped; de hecho algunos plásmidos se acoplan en este proceso al cromosoma bacteriano y son transmitidos muy fielmente durante la división celular, es normal por ello encontrar pocas copias del plásmido e incluso una por célula huésped y entonces se dice que su replicación está bajo "control estricto". En general este grupo de plásmidos requiere una(s) proteína(s) iniciadora(s) de replicación codificada(s) por sí mismos e incluye a plásmidos FII y al plásmido



pSC101(12,13).

Otros plásmidos no cuentan con tal control estricto y para asegurar cierta fidelidad de transmisión en una división celular a pesar de su segregación aleatoria, se replican en un número relativamente alto de copias que bien puede ser de 10 a 200. El caso mas extensivamente estudiado es el del plásmido ColEI (14), así como de un grupo de plásmidos referidos como tipo ColEI(17); su replicación está bajo un "control relajado", no requieren de ninguna proteína de replicación específica del plásmido y característicamente su número puede incrementarse a varios miles por célula si la síntesis de novo de las proteínas del huésped es detenida(15). En este estado metabólico celular la replicación de plásmidos relajados continúa mientras la replicación del DNA cromosómico y plásmidos controlados estrictamente, cesa.

Los plásmidos de replicación relajada y particularmente los derivados del pBR322(16,17,18) han sido los más ampliamente utilizados en Ingeniería Genética y Biotecnología. Comprender sus mecanismos de replicación permitirá un mejor aprovechamiento de los sistemas de expresión de la información genética.

Por otro lado, los plásmidos tipo ColEI no son conjugativos, pero si movilizables en presencia de otro plásmido conjugativo. Se han descrito dos loci involucrados en el fenómeno de movilización, mob y hom (19,20). mob codifica una nucleasa, capaz de hacer una mella sobre una secuencia de bases específica llamada bom. En el pBR322 se elimino mob durante su construcción (16,21), en sus derivados pBR327 y pBR328 ha sido removido también hom (18). Esto es de gran importancia en la contención biológica de un vector en experimentos de clonación molecular.

En el presente trabajo han sido elegidos plásmidos derivados del pBR322 como sistema modelo.

## 1.2 Aspectos particulares de la replicación de plásmidos tipo ColE1

Dentro de este grupo de plásmidos son considerados, al menos: pBR322 (derivado del pMB1), P15A, RSF1030, CloDF13 y el mismo ColE1. Todos ellos son replicados unidireccionalmente por mecanismos que dependen 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 (22), 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 prácticamente idéntica (22,23,24).

La incorporación del primer dNTP requiere un extremo 3'OH, que es provisto por la síntesis de una molécula de RNA denominada "primero" o RNA II. Después de ser transcrito a lo largo de la zona del origen, forma un híbrido RNA-DNA susceptible a un corte endonucleolítico específico por la RNasaH, produciendo así el extremo 3' y un templado de DNA, elementos genéticos indispensables para que se de el inicio de la replicación (22,24,25,26).

Por otro lado la regulación del proceso descrito anteriormente depende básicamente de la participación de otra molécula, el RNA I (27). Su zona codificadora está incluida en la región que especifica al RNA "primero", pero sobre la cadena opuesta, de tal manera que el RNA I es capaz de interactuar con el RNA "primero" ocasionando que

este último no sea procesado para formar un extremo 3', funcional. La especificidad y el equilibrio de este proceso de interacción determinarán, respectivamente, las propiedades de incompatibilidad y el número promedio de plásmidos por célula (28,29,30,31). Es sabido que al menos los plásmidos ColE1, pBR322 y CloDF13, expresan adicionalmente la proteína ROP (o RON) que participa en el control de replicación modulando la interacción de RNA I con el RNA "primero" (32).

Es necesario describir algunas de las particularidades del proceso replicativo que faciliten el planteo del problema de investigación que a este trabajo concierne. La mayoría de los estudios han sido realizados en ColE1 y pMB1, y no son necesariamente válidos para todos los plásmidos.

Como ya se ha explicado, el proceso de iniciación replicativa en ColE1 consiste de varios pasos sucesivos (fig 2): la síntesis del RNA I (precursor del "primero") es iniciada en un sitio a -555 pares de bases (pb) del origen de replicación (26). Todo par de bases que anteceda al origen de replicación, será señalado con números negativos y los que le sucedan con números positivos. La mayor parte de la transcripción continúa más allá del origen de replicación (ori) y aproximadamente la mitad de los transcritos nacientes forman un híbrido pequeño y persistente que se extiende sobre la zona del origen (26). El RNA hibridizado es hidrolizado en ori por la RNasaH en un sitio específico (en realidad son tres sitios alternativos y contiguos) (22), formando el "primero" para el inicio de la replicación por la polimerasa I de 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

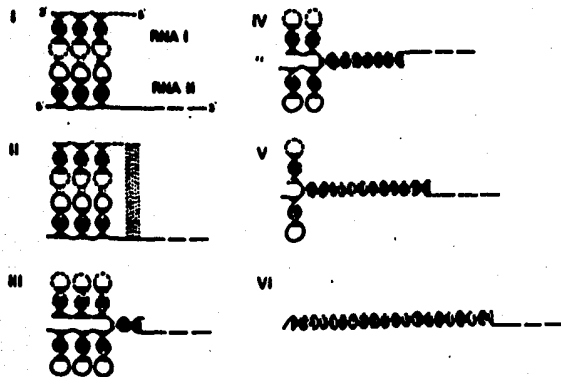
Varias líneas de evidencia sugieren que el RNA II debe adquirir una conformación particular durante la transcripción que le permita formar un "primero" funcional, es decir que las estructuras secundarias que se establecen a lo largo del RNA II juegan un papel importante en el control de eventos de procesamiento del origen. Ha sido observado que la formación del "primero" se ve inhibida por la sustitución al azar por IMP (monofosfato de inosina) en vez de GMP (monofosfato de guanosina) en el RNA II (36) en cualquiera de varias regiones, inclusive más arriba que -400. Recientemente se han encontrado mutaciones puntuales en la región entre el promotor de RNA II y ori que pueden afectar pasos específicos en el proceso de formación del "primero" (33), tales como la formación del híbrido, el sitio de corte por la RNasaH, la estabilidad del híbrido DNA-RNA, y la funcionalidad del "primero" para iniciar la síntesis de DNA (tabla 1). Estas mutaciones y sus consecuencias parecen reflejar cambios conformacionales en el RNA II ya que se han observado, in vitro, diferencias en la accesibilidad de estas moléculas alteradas a RNasa T1 y RNasa A, y por otro lado existen mutaciones supresoras distales sobre el mismo RNA II (33). Una segunda línea de evidencias involucra al RNA I, un pequeño transcrito de 108 nucleótidos que es complementario a la región 5' terminal del RNA "primero" y que como ya se comentó está implicado en el control del número de copias. Este último dato se basa en el análisis de los efectos producidos por mutaciones dentro de su región codificadora (29,30). El análisis estructural del RNA I indica que esta molécula asume una conformación que comprende tres estructuras de tipo tallo-asa y una cola de cadena sencilla sobre el extremo 5', características tales que su alteración

Table 1. The *pri* and *spr* Mutations and Their Effects on Primer Formation

Mutation	Position	Base Change	RNA II Synthesis	Hybrid Formation	RNAase H Cleavage Site	Stability of RNA/DNA Hybrid	Priming of DNA Synthesis	
<i>pri1</i>	-308	G→A	No effect	Blocks	—	—	—	
<i>pri2</i>	-288	G→A	"	Blocks	—	—	—	
<i>pri3</i>	-265	G→A	"	Reduces	No effect	No effect	No effect	
<i>pri4</i>	-264	G→A	"	Reduces	"	"	"	
<i>pri5</i>	-10	C→U	"	No effect	Alters	Alters	"	
<i>pri6</i>	-188, -186	G→A, G→A	"	"	No effect	No effect	Inhibits	
<i>pri10</i>	-562 to -576	T:A insertion	Blocks	—	—	—	—	
<i>spr41</i>	-19	G→A	Enhances hybrid formation by <i>pri4</i> RNA II and decreases that by wild type or <i>pri3</i> RNA II					
<i>spr42</i>	-18	G→A	Same as <i>spr41</i>					
<i>spr61</i>	-181	C→U	Increases primer activity of <i>pri6</i> RNA II					

Tabla 1.  
Las posiciones de las mutaciones se presentan como números negativos, que indican el número de pares de bases hacia atrás del origen. Los cambios de base en el RNA II son presentados excepto para *pri10*, que tiene una inserción de un par de bases T:A en un trazo de siete T:A pares de bases aproximadamente a 30 pb hacia arriba del sitio de inicio del RNA II. El signo - indica que el ensayo no es aplicable. Los plásmidos ColE1 mutantes, de replicación deficiente se aislaron en replicones bifuncionales. El análisis de la capacidad de -- formación del primero se hizo in vitro. En todos los casos la transcripción -- se abrió en un sitio a +220 pb del origen, con la inserción en ese lugar del terminador del gene *recA* de *E. coli*. Se denominaron mutaciones *pri*, a aquellas afectadas en la formación del primero. Algunas fueron suprimidas (*spr*). Tabla tomada de ref. 33

espacial produce una disminución en la actividad del RNA I (37,38,39). Por otro lado datos bioquímicos sugieren que el RNA I ejerce su control negativo sobre la replicación del plásmido a través de su interacción con el RNA "primero" naciente y su efecto sobre la susceptibilidad de éste a un procesamiento por la RNasaH (28,29), ya que si es adicionado durante etapas tempranas de transcripción del RNA II in vitro, el RNA I se aparea a su región complementaria naciente y con ello se inhibe su procesamiento, 400 nucleótidos adelante, o sea en el origen (fig 3). En contraste, el RNA I no tiene efecto si es adicionado despues de que se haya completado la transcripción del RNA II (28). Una explicación de 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 (29). Hong y Polisky (40) han estudiado esta proposición, al examinar la estructura del RNA "primero" en etapas tempranas y tardías de su formación, y sus análisis enzimáticos de la estructura secundaria sugieren que se forman dominios estructurales alternativos conforme el RNA "primero" va siendo transcrito (fig 4). Adicionalmente ellos han determinado las constantes de velocidad para la asociación de moléculas de RNA II de diferentes longitudes con el RNA I y 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 más rápido que cuando tiene otras formas más largas o más cortas. Lo que estos últimos datos implican con relación a la regulación negativa que se deriva de la interacción RNA I-RNA II es que el



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. 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 a ojal van corriendo. El apareo se propaga progresivamente sobre los palíndromos 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). Análisis del proceso de apareamiento in vitro entre el RNA I y una porción de RNA II (transcrito de 240 nt, obtenido en un "run-off") se hizo a partir del sitio de sensibilidad del RNA I a RNase T1 (endonucleasa que ataca al enlace codificante C<sub>3</sub>U), a diferentes tiempos de incubación. El efecto de distintas acciones sobre RNA I y RNA II, sugirió que la interacción inicial es entre las estructuras plegadas a través del apareamiento de las bases complementarias en el centro de los palíndromos. La remoción de 5 nucleótidos del extremo del RNA I, reduce sustancialmente su interacción con el RNA II. Probablemente el apareamiento empieza cerca extremo 5' del RNA I, etapa III. Fig. tomada de la ref. 39

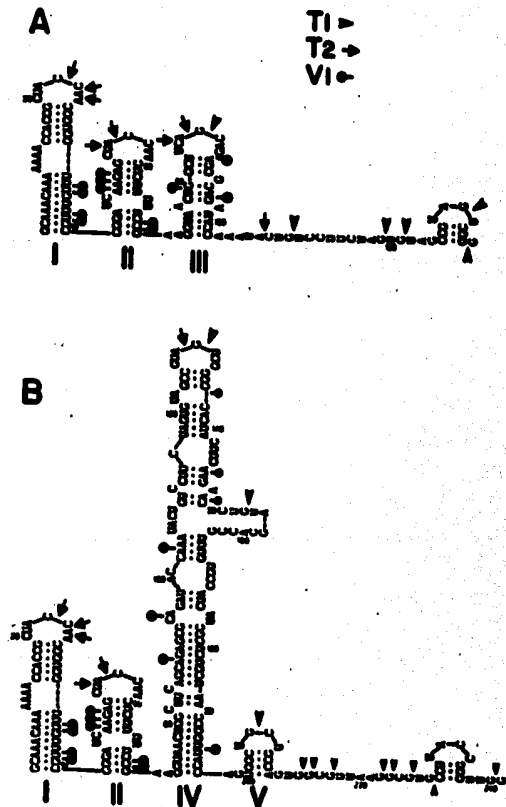


Fig. 4. Resumen de los patrones de corte para el transcrito parcial del RNA II PR135 (de 135 nt) y PR241 (de 241 nt). Los principales sitios corte por RNasa T1 ( $\blacktriangle$ ), RNasa T2 ( $\blacktriangledown$ ), y RNasa V1 ( $\circ$ ) son mostrados sobre la estructura secundaria para PR135 (A) y PR241 (B). Los dominios tallo-ojal son marcados con números romanos abajo de cada estructura. PR135 (con los mismos palíndromos mostrados en la Fig. 3), interactúa con el RNA I aproximadamente 5 veces más rápida que PR241. La transcripción de secuencias hacia abajo del nucleótido 135, abota la estructura III y puede reducir la interacción hasta 35 veces. Figura tomada de la ref. 41

conocimiento de las concentraciones intracelulares 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 (33) sugiere fuertemente que la cinética de interacción de estas moléculas está también en función de la conformación del RNA "primero", lo que les permite postular un nivel regulatorio adicional.

Finalmente, lo que estas estructuras parecen estar poniendo de manifiesto, es una estructura secundaria muy compleja a lo largo del RNA II (fig 5), 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 RNasaH o de la polimerasa I de DNA, según sea el caso.



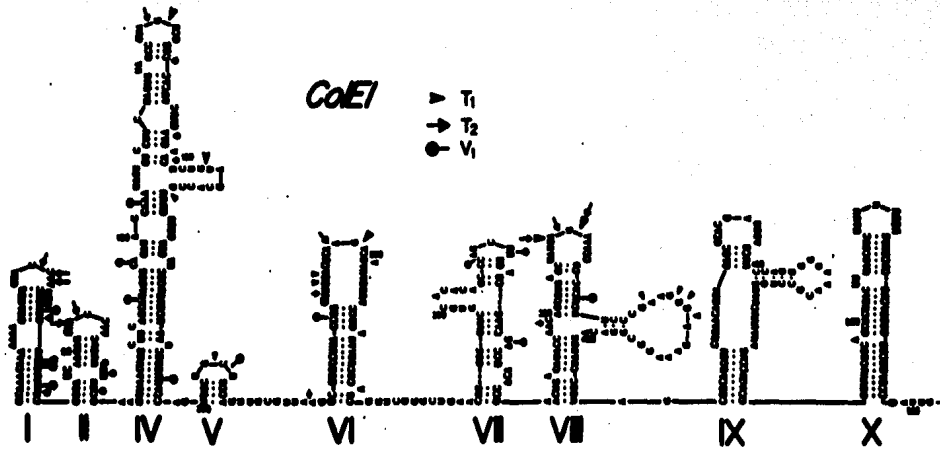


Fig. 3. Resumen de los sitios de corte por las RNases sobre el RNA primario P2355 (de 535 nt). Los principales sitios de corte se muestran como en la figura 4. El grado de corte en cada posición se indica por el tamaño de la flecha. El transcrito de 535 nt puede ser un primer ya que es procesable por la RNasaM. Se hace notar que la estructura VIII, difiere con la estructura propuesta en ese lugar por Tomiwa et. al. (Fig. 10). Un primer de esta longitud reduce su interacción con el RNA I hasta 35 veces vs. un transcrito de 135 nt. Fig., tomada de la ref. 49

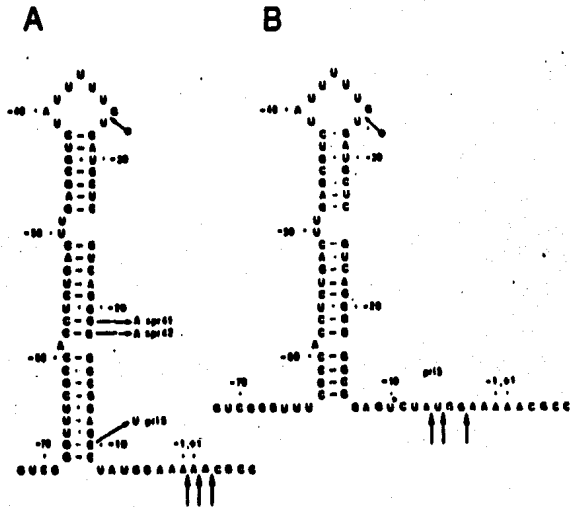


Fig. 4. Posibles estructuras secundarias del RNA II cerca del origen de replicación. La figura muestra las estructuras tallo-asa posibles en el RNA II silvestre y con la mutación pri 3 cerca del origen de replicación como se predijo por análisis computacional. La energía libre de formación para las estructuras A y B con el RNA II, fueron calculadas como -34.8 Kcal y -34.8 Kcal respectivamente, y estas mismas con la mutación pri 3 son -34.8 Kcal para ambas, las flechas en la base de la estructura A indican los principales sitios de corte del RNA II silvestre por la RNasaM. El RNA II pri3 tiene sitios de corte adicionales mostrados en la base de la estructura B. Las flechas con círculos corchados muestran los sitios de corte por RNasa T1. El análisis de esta mutación in vitro, sugiere que el RNA II pri3, no altera la formación del híbrido inicial, ni la eficiencia de corte por la RNasa M (Tabla 1). La inestabilidad del RNA II procesado o híbrido al templado de RNA, parece ser la causa principal de la replicación defectuosa asociada. El plásmido con una mutación se replica autónomamente de pC201 (estas mutaciones se aislaron en plásmidos bifuncionales, ori 14 y pC201-ori pC201), pero pobremente. Las células portadoras de este plásmido formaciones más pequeñas que aquellas portadoras de un plásmido silvestre. Fig., to-

## II -DEFINICION DEL PROBLEMA

Nuestra hipótesis de trabajo es que la región de replicación constituye en realidad dos dominios separados, al servicio respectivamente, de la producción de un "primero" eficaz en replicación y de su regulación.

Nuestro interés consiste en delimitar la región mínima que sería necesaria para el primer proceso, es decir formar el "primero" replicativo.

Las razones y evidencias que sustentan la hipótesis podrían resumirse como sigue.

El origen es un complejo de ácidos nucleicos que es sustrato de RNasaH, permite la elongación unidireccional, y persiste hasta el final de la replicación. Es posible pensar que no todos los 555 nt que constituyen el RNA "primero" se requieran para formar un "primero" replicativo. Esto es, que al menos 100 nt (los complementarios al RNA I) son para regular y 400 nt participan en la formación del sustrato de la RNasaH y en la comunicación del efecto producido por la unión del RNA I.

La composición estructural del RNA II es compleja ya que tiene estructuras competitivas, es decir, que la formación de unas impide la de otras. Por esto, una mutación por sí sola nunca puede ser completamente interpretable. Sin embargo es sugerente la mutación  $\Delta$ jl (36) y algunas otras en diferentes tallos y asas a lo largo del RNA II. La mutación

$\Delta$ jl es una delección que remueve las estructuras I, II, III (incluye el mensaje y el sitio de unión para el RNA I), no obstante el plasmido

es replicable. Diferentes mutaciones puntuales aparentemente alteran la estabilidad estructuras particulares afectando la eficiencia de replicación. tal es el caso de la mutación svir 19 (30), situada a -474 del origen. Esta mutación incrementa la estabilidad de la estructura IV (dicha estructura compete con la estructura III, es decir, con la unión del RNA I) y produce una replicación incontrolada en el plasmido, letal para la célula huésped. En caso de que la zona en que está incluida la estructura IV, participe solo como un medio de comunicación de la regulación producida con la unión del RNA I, es concebible que el sustrato para la RNasa H sea un transcrito menor de 400 nt. La mutación prj 5 (33) situada a -10 del origen (tabla I), desestabiliza la estructura inmediatamente anterior al origen y permite alternativamente la formación de una estructura similar (fig 6), con esta última estructura la formación del "primero" es ligeramente menos eficiente, y el sitio de corte por la RNasaH se desplaza 5pb hacia abajo con respecto al sitio silvestre, pero igualmente se mantiene a  $9\pm 2$  pb (esta es la longitud del híbrido) de la base del tallo. Otras mutaciones puntuales se han descrito sobre diferentes estructuras, que afectan de una manera que no es clara (directamente o indirectamente), la estabilidad del híbrido RNA-DNA, o la presentación del "primero" a la polimerasa I. En algunos casos hay mutaciones supresoras distales (tabla I).

Como es de esperarse, diferentes deleciones del extremo 5' del RNA II pueden generar mutantes con gran actividad de "primero" sin regulación, y ciertos casos por su letalidad sobre la célula huésped no podrían aislarse. En la siguiente sección proponemos un sistema experimental para contender con estos casos.

### III -SISTEMA EXPERIMENTAL

Se usarán plásmidos derivados del pBR322, todos ellos del mismo grupo de incompatibilidad de ColE1. Para delimitar el sustrato enzimático de la RNasaH serán producidas deleciones progresivas a lo largo del RNA II desde su promotor en dirección a ori. Con esto se pretende que el primer dominio de esta molécula en ser afectado sea el que interacciona con el RNA I (fig 3 y 4A), de tal manera que la regulación dada por la interacción RNA I-RNA II quedaría abolida parcial o totalmente, produciéndose en algunos casos plásmidos super-replicones que la célula huésped no pueda mantener. Otra posibilidad es que aun cuando no haya control del número de copias por medio del RNA I, los transcritos mutantes pudieran hacer híbridos inestables, o primeros poco eficientes, permitiendo así cierta viabilidad celular.

Entre otros cuestionamientos, habrá que atender las interrogantes inmediatas que de este enfoque experimental se desprenden: A partir de que promotor será transcrita la región del RNA II deletada?; Como serán producidas las deleciones exclusivamente unidireccionales (a partir del promotor del RNA II en dirección al origen)?; Como aislar y mantener los plásmidos mutantes de replicación incontrolada y consecuencias letales?.

Para contender con estos problemas básicos, diseñamos un sistema experimental que contempla esencialmente la construcción de un plásmido de replicación bi-funcional por medio de técnicas de recombinación genética in vitro y su replicación en una cepa de E. coli mutante condicional, temperatura sensible. El plásmido estará

constituido por dos orígenes de replicación compatibles, tales que por medio de cambios ambientales controlados (temperatura), sea posible elegir el origen a partir del cual se replique in vivo. Para recuperar los plásmidos mutados en el RNA II se transforma E. coli y el origen tipo ColEI se mantiene apagado por lo que la replicación proceda a partir del origen no manipulado. En el momento que se desea manifestar el fenotipo generado por las mutaciones se activará el origen procesado.

La construcción también deberá incluir un promotor que anteceda lo más inmediatamente posible (en el extremo 5') al promotor del RNA II. Estará orientado hacia el origen y será eficiente e inducible, esto último está en relación a la estimulación de super-replicones ya que la letalidad asociada a estos puede ser un criterio de selección importante.

Otro requisito que deberá cumplir la construcción será la de tener un sitio único de restricción entre el promotor accesorio y el promotor del RNA II. A partir de este sitio serán generadas las deleciones unidireccionales sobre el marco de lectura de RNA II. Para esto, el plásmido será linearizado y tratado de dos modos diferentes:

a) en uno el extremo que se desea conservar íntegro será protegido de la degradación producida por una exonucleasa. b) en otro, los extremos serán degradados y posteriormente el extremo deseado será reconstituido con la sustitución del fragmento terminal tratado, por otro íntegro.

#### IV - MATERIAL Y METODOS

(1) Cepas bacterianas y plásmidos. Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo se indican en la siguiente tabla.

	genotipo o fenotipo	fuentes
<b>A) <u>Escherichia coli</u> K12</b>		
KK1	F- <u>hsdS20</u> (r-B,m-B) <u>lac</u> AB	Boyer H.H., (41)
	<u>ara-14</u> <u>argA2</u> <u>lacY1</u> <u>galKZ</u> <u>rpsL20</u>	Roulland-Doussoux
	<u>Sm</u> (r) <u>xyl-5</u> <u>mtl-1</u> <u>supE44</u>	(a)
( <u>pol</u> <u>Ats</u> )	<u>pol</u> <u>Ats</u> (polimerasa I de DNA temperatura sensible)	C. Gomez-Eichelmann (b)
<b>B) Plásmidos</b>		
pBR431	<u>ori</u> tipo <u>ColE1</u> (pMB1) Cm(r), Tc(r)	H. Zurita (enviado a publicación)
pΔ37ori	<u>ori</u> tipo <u>ColE1</u> (pMB1) <u>ori</u> pSC101, Ap(r)	H. Zurita (42)
pB54	Replicón bifuncional: <u>ori</u> tipo <u>ColE1</u> , <u>ori</u> pSC101, Cm(r), Tc(r). Derivado de pBR431 y pΔ37ori	este trabajo
pB543	Como pB54, pero deletado entre Cm y <u>ori</u> pSC101	este trabajo

-----

(a) Para las cepas bacterianas se utilizó la nomenclatura propuesta por Taylor et al(43). Para las resistencias a antibióticos se utilizaron las siguientes abreviaturas: Ap(r), ampicilina; Cm(r), cloranfenicol; Tc(r), tetraciclina; Sm(r), estreptomina.

(b) La presencia de la mutación polA1s se probó por la hipersensibilidad a HMS (sulfonato de metil metano) de la cepa durante un crecimiento en líquido a 30°C y 42°C

(2)Medios de cultivo. Como medio de cultivo se utilizó el medio Luria(44). El medio sólido se hizo con Bacto-Agar(Difco). Los antibióticos se añadieron a las concentraciones siguientes: Ap 100 ug/ml; Cm 20 ug/ml; Tc 15ug/ml; Sm 40ug/ml.

(3)Preparaciones de DNA de plásmidos en pequeña escala. se utilizó el método de extracción alcalina (45).

(4)Digestiones de DNA plasmídico con enzimas de restricción. El DNA de plásmido se digirió según las condiciones sugeridas por New England Bio-Labs, con enzimas de restricción obtenidas de Bio-Labs, P. Biotech y la Unidad de contención y reactivos biológicos del CEINGEBI/UNAH.

(5)Titulación de la exonucleasa Bal31. El plásmido pBS43 fue digerido con SmaI, tratado con fenol-cloroformo y recuperado por precipitación en etanol. Posteriormente se expuso a 0.2U de Bal31 (Promega-Biotech). A diferentes tiempos, la degradación fue detenida con fenol-cloroformo y el DNA se recuperó por precipitación para ser digerido con HaeIII. Después fue separado en un gel de acrilamida al 7.5%. Fue estimada una degradación de 850-900 pb/ug DNA/1U Bal31/min

de reaccion en un volumen de un ml, a temperatura ambiente (fig 13).

(6) Electroforesis en geles de agarosa y acrilamida. Las condiciones para electroforesis en agarosa y acrilamida han sido descritas previamente (46)

(7) Otras enzimas utilizadas para el manejo del DNA.

Tipo	Origen	condiciones de reaccion
Ligasa T4 de DNA	<u>E.coli</u> ; Bio-Labs	Bio-Labs
Polimerasa de DNA (frag. grande-Enz.Klenow)	<u>E.coli</u> ; Boehringer	Bio-Labs
Fosforilasa de polinucleotidos	<u>E.coli</u> ; Bio-Labs	Bio-Labs
Nucleasa Bal-31	<u>A.esperitai</u> ; P.Biotech	Bio-Labs

(8) Sintesis quimica de oligonucleótidos. Se uso el método del fosfotriester en fase sólida, desarrollado por K.Itakura y sus colaboradores (41). La sintesis del undecamero 5'-ATCTCCCTGCA-3', fue realizada en el Depto. de sintesis quimica de macromoleculas del CEINGEBI, bajo la asesoria del Quimico H.A.Cuevas.

(9) Fosforilacion y marcaje radioactivo de oligonucleótidos sinteticos. El producto oligonucleotidico de una sintesis quimica no está fosforilado en su extremo 5'. El marcaje radioactivo se hizo, adicionando 50 uCi de  $^{32}P$ -PiATP a una mezcla de Fosforilasa, con 20-40 pMolas del undecámero. Después de 30 min, se adiciono 10 nMolas de ATP "frio" otro tiempo igual (este último paso es suficiente para la fosforilacion en frio).



(10) Actividad de exonucleasa 3' → 5' del fragmento Klenow de polimerasa I de E. coli. Esta actividad es considerablemente menor que la de polimerasa presente también en este fragmento. Se usó el siguiente amortiguador de reacción, 10X: 1M NaCl, 65mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM HgCl<sub>2</sub> y 10 mM B-mercaptoetanol. El tratamiento se dio a temperatura ambiente, al menos por 4 horas para retirar 7 nucleótidos determinados (la reacción fue parada con dGTP), del pBS43, con buena eficiencia.

(11) Transformación genética de una cepa de E. coli. Se utilizó el método de Cohen et al(13) con algunas modificaciones:

a.- 30 ml de cultivo con  $5 \times 10^8$  células por ml creciendo exponencialmente en medio Luria, se centrifugaron a 10k en el rotor JA20 por 5 minutos y el precipitado o "palet" se lavó con 15 ml de NaCl 10mM frío.

b.- El precipitado se resuspendió en 15 ml de CaCl<sub>2</sub> 50-100mM frío y se mantuvo en hielo por 20 minutos.

c.- Se centrifugaron las células a 10,000 rpm en el rotor JA20 por 5 minutos y se resuspendieron en 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 50-100mM.

d.- A 0.2 ml de la suspensión se agregaron 20-100ng del plásmido circular en 0.1 ml del mismo calcio frío.

e.- Se mezcló suavemente y mantuvo el recipiente por 60 minutos a 0°C.

f.- Se dio a las células un pulso térmico a 42°C por 70 segundos y se pasaron inmediatamente a 0°C por 5 minutos.

g.- Se agregaron 3 ml de medio Luria y se incubó a 37°C con agitación (200 rpm) por 1 hora.

h.- Se sembró (0.1-0.3ml) en cajas Petri con medio Luria sólido (2%

agar, y el antibiótico respectivo para la selección de las transformantes.

(12) Preparación de DNA de plásmido en gran escala. El DNA de plásmido se preparó previa amplificación (ori Tipo ColE1) de cultivos en fase logarítmica tardía (D.O. - 0.6), mediante de la adición de 170mg/ml de Cm o 300 mg/ml de espectinomicina(15).

La extracción y purificación se hizo conforme al método de lisado claro descrito por Betlach et al. (42) y consta de los siguientes pasos para 1 litro de cultivo.

- a.- Se incubó 5-10 ml de cultivo en medio Luria toda la noche.
- b.- Se agregó 5 ml de este inóculo a 1 lt de medio M-9.
- c.- Se agitó el cultivo a 37°C (200rpm) hasta alcanzar una densidad de  $4.5 \times 10^8$  cels/ml. Fue agregado el antibiótico y se volvió a agitar 16 hrs.
- d.- Se centrifugaron las células (rotor GSA o JA14) a 6 k por 10 min.
- e.- Se resuspendieron las células en 10 ml. de Sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 1mM pH 8, y mantuvo en hielo.
- f.- Se agregó en el orden indicado:  
2 ml de EDTA 0.25M, pH 8.  
1 ml de lisozima (5 mg/ml en Tris-HCl 0.025 M, pH 8. 0.1 ml RNasa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1 M; EDTA  $3.3 \times 10^{-3}$  M, pH 7; precalentada 10 min. a 85°C para eliminar DNasas).
- g.- Se mezcló suavemente y se dejó reposar en hielo 15 min.
- h.- Se agregó 3 ml de mezcla lítica Triton 3X (3 ml Triton X-100 al 10%, 75 ml de EDTA 0.025 M, 15 ml de Tris-HCl 1M pH 8, 7 ml de agua), se mezcló suavemente y se dejó reposar en hielo 15 min.
- i.- Se centrifugó en tubos de polipropileno (rotor SS34 o JA21) a 17k por 40 min.

j.- Se midió el volumen del sobrenadante , se vació en una botella de plástico de 250 ml, y se agregó un volumen de agua desionizada.

k.- Se agregó un volumen de fenol frío saturado (saturación en amortiguador: mezcla 1:1 de fenol, destilado sobre zinc, y Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM pH 7.5. Equilibrar 16 hrs en agitación a 4°C), se mezcló , se agregó un volumen de cloroformo y se agitó.

l.- Se centrifugó (rotor HS-4) a 6.5K, 10 min.

m.- Se transfirió la fase acuosa a otra botella, evitando la película de proteínas de la interfase.

n.- Se agregó 1/20 del volumen total de NaCl 5M y agitó. Se adicionó 2.2 volúmenes de etanol a -20°C y se dejó reposando 1.5 hrs a -70°C para que el DNA precipitara.

o.- Se centrifugó a 6,500rpm en el rotor JA14 o HS4, por 60 min. Fue descartado el sobrenadante y luego secado el sobrenadante.

p.- Se resuspendió el precipitado en 5 ml de agua y se cargó en una columna de A50 (cromatografía por filtración con partículas de gel de agarosa, Bio-Rad.) de 2x35 cm. Colectar fracciones de 4ml de amortiguador A50 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, pH8, NaN3 1mM, EDTA 1mM, pH8).

q.- Se determinó la D.O. a 260 nm de las fracciones. Fue atendido especialmente las fracciones 10-20 (1 D.O. = 50 ug de BNA/ml).

r.- A las fracciones de interés se les adicionó 2.2 volúmenes de etanol a -20°C. Se dejó reposando a -70 1.5 hrs.

s.- Se centrifugó a 6.5K en el rotor JA14 o HS4, por 60 mins, se decantó y se secó.

t.- Se resuspendió el precipitado en 2.1 ml de agua filtrada o amortiguador TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris) conteniendo hasta 0.5 mg de DNA.

- u.- Se preparó un gradiente isopícnico al equilibrio en CsCl y Pdl:.
- 2.1 gr de CsCl.
  - 2.1 ml de DNA en solución.
  - 0.150 ml de Pdl a 2 mg/ml( debe trabajarse en la sombra a partir de este momento ya que Pdl se intercala en el DNA y al contacto con la luz produce mellas en este).
  - Despues de mezclar todo lo anterior se adicionaron 2.3 ml de aceite mineral para llenar los tubos.
- v.- Se centrifugaron en el rotor SW50.1(Beckman) a 38K por 20 hrs. a -20°C.
- w.- EL Pdl intercalado en el DNA plasmídico fluoresce al ser irradiado con Luz Ultravioleta(U.V.). Se manifestaran dos bandas en el tubo: la superior que contiene DNA mellado y lineal y la inferior que contiene al plásmido superenrollado.
- x.- Se colectó la banda inferior, picando el fondo del tubo.
- y.- Se extrajo el Pdl del DNA solubilizandolo en n-Butanol o Alcohol Amílico, mezclando un volumen del solvente por volumen a tratar, y se centrifugó 1 min. a 7000rpm en una microfuga eppendorf. Se repitio la operación 5-6 veces. La extracción se puede hacer pasando la solución de DNA través de una columna de intercambio iónico (Dowex 50W-X8, Bio-Rad).
- z.- Se determinó la concentración del DNA. Si se mide D.O. usece el espectrometro a 260 nm. Se recomienda emplear el DNA a 0.3-0.5 ug/ml.

## V - RESULTADOS

V.1 Caracterización de una cepa de E. coli pol Ats (temperatura sensible).

Las mutantes del locus pol Aigene estructural de la polimerasa I, en E. coli tienen disminuida su capacidad de reparación de lesiones en el DNA (48,49), por eso son sensibles a luz ultravioleta o a mutagenos como el sulfonato de metil metano(MMS) que es una droga radiomimética. La cepa utilizada en este trabajo fue facilitada por la Dra. H.C. Gomez Eichelmann. Recientemente esta misma cepa ha sido utilizada por Castaño et al (50), aprovechando sus efectos a 30°C y 42°C sobre la replicación de plásmidos tipo ColE1. En la literatura se ha descrito ampliamente al menos una mutación similar. La cepa polA12 ts ("missense") de Kinross (49) es tan sensible a U.V. y MMS a 42°C-temperatura restrictiva- como otra cepa la pol A1("nonsense") de Cairns (48), y a 30°C si bien mejora su viabilidad, no alcanza los niveles de recuperación de una cepa silvestre.

Para revisar el fenotipo de nuestra cepa pol Ats se uso MMS en concentraciones de 0.01 y 0.015% en crecimientos a 30°C y 42°C. El crecimiento a la temperatura restrictiva fue apreciablemente menor. Con concentraciones mayores a 0.02% el crecimiento fue inhibido fuertemente. Como control se uso la cepa Rkl pol Ats(silvestre) en las mismas condiciones. Esta no mostró diferencias en su crecimiento y como también era de esperarse, fue mejor que el de la cepa Pol Ats a 30°C. Para demostrar que el fenotipo de esta cepa a 42°C no permite una replicación significativa de plásmidos tipo ColE1, la mutante fue transformada con plásmidos derivados del pBR322 y crecida bajo

transformada con un plásmido portador del origen de pSC101, que tiene una replicación independiente de la polimerasa I. A la temperatura restrictiva los plásmidos tipo ColE1 no produjeron transformantes, en contraste a los plásmidos independientes de la polimerasa de Kornberg.

Lehman (51) observó que la polimerasa I purificada de la cepa pol A12 tiene una movilidad electroforética reducida y un coeficiente de sedimentación menor al de la proteína silvestre, pero sus pesos moleculares son análogos. Por lo anterior parece poder relacionarse su termolabilidad a un plegado anómalo de la enzima mutada.

#### V.2 Construcción del plásmido pBS4

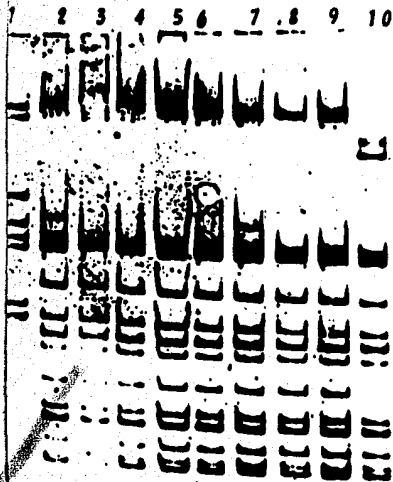
Dado que la mutante pol<sup>-</sup> A15 de E. coli permite la interrupción eficiente de la replicación de plásmidos dependientes de polimerasa I, a la temperatura restrictiva de cultivo, se decidió que en el plásmido de replicación bifuncional, el origen accesorio a pri tipo ColE1, sería el del plásmido pSC101, cuya función es independiente de polimerasa I. Estos dos orígenes replicativos ya han sido utilizados conjuntamente en la construcción de plásmidos con replicación bifuncional (52). Cohen et al. han probado que en condiciones permisivas de crecimiento de una cepa pol<sup>-</sup> A15(30°C), el origen de replicación funcional es esencialmente el del plásmido tipo ColE1, y que en condiciones restrictivas(42°C) exclusivamente opera el de pSC101 (52).

El origen de pSC101 fue aislado en un fragmento (2942 pb) obtenido del plásmido p $\Delta$ 37ori (42), después de una digestión total con la enzima de restricción Hind III. El origen tipo ColE1 utilizado fue el

del plasmido pBR431. (Zurita et al., sometido a public.). Esta molecula se linearizo con Hind III y fue ligada in vitro al fragmento mencionado. Con las moleculas recombinantes se transformó E.coli pol a 42°C en un medio con Tetraciclina (15 ug/ml). En estas condiciones de crecimiento, p $\Delta$ 37ori ni pBR431 producen transformantes. En todas las transformantes que fueran analizadas con la restriccion del DNA preparado en pequena escala (Ver material y metodos), se encontro el patron esperado. Con Hae III y Hpa II es similar al patron de pBR431, mas otros fragmentos de alto peso molecular provenientes de pSC101 (fig 7). Los patrones de digestion anteriores no resolvieron la orientacion en que habia sido clonado el origen de pSC101. La digestion con Sma I (reconoce o pb) hace un solo corte en cada una de las moleculas ligadas y esto nos permitio observar al origen de pSC101 clonado en las dos orientaciones.

Cabe senalar que en la seleccion de estos plasmidos recombinantes, aun cuando se hizo a una concentracion de tetraciclina inferior a la concentracion estandar (20-30 ug/ml), las colonias fueron pequenas y requirieron mas de 20 hrs de crecimiento para ser manipulables. Se esperaba que al menos una de las orientaciones del inserto reestableciera eficientemente el marcador de resistencia a tetraciclina, ya que parte de la region de -35 en su promotor (53) quedaria substituida por DNA del inserto, dada la ubicacion del sitio de clonacion.

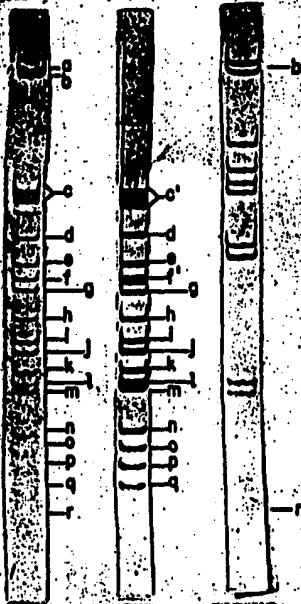
Debido a que las dos orientaciones del origen de pSC101, no producen diferencias notables entre si, se eligio un plasmido que fue llamado p554 (fig 8), un plasmido (6500pb) que contenia dos origenes de replicacion compatibles y en la misma orientacion (fig 9), ademas de un promotor accesorio altamente eficiente "upstream" al promotor del



Electroforesis en gel de Acrilamida, 7.5%. Digestiones con los enzimas I y 10 muestras a pΔ37ori y a pBR431 respect. Los carriles 2-9 muestran las patrones de plásmidos cortados con pΔ37ori y pBR431. Estos plásmidos fueron colonizados en E. coli patente, en medio Luria con W<sub>2</sub>, a 42°C. El DNA se cortó en el estado de línea aleatoria. Nota que la banda b (Fig. 6) que es el pBR431, y en su lugar aparecen la banda más grande 11. Este plásmido tiene el locus *lac* por duplicado sobre el sitio b (Suzuki et al. insertado a publicación).

### Hae III

pBS4 pBR431 pΔ37ori



TAMAÑOS- FRAGMENTOS		
pBS4		pBR431
a	1537	
b	1118	
c	434	c
	410	
	392	
	391	
d	255	
e	222	
f	234	f'
g	213	
h	168	
i	130	
j	124	
	123	
k	104	
l	92	
m	89	
	87	
n	64	
o	57	
p	51	
q	47	
r	38	

Fig. 6. Electroforesis en gel de Acrilamida, 7.5% de pΔ37ori, pBR431 y pBS4, en los carriles A, B, y C respectivamente, cortados con Hae III. Nota que la banda de 230pb en pBR431, ha desaparecido en pBS4 (insuya sitio donde se inserta el fragmento de pΔ37ori), en su lugar han aparecido bandas de 410, 1537 (bandas de fusión), 39 y 1100 (bandas internas de pΔ37ori). El DNA fue preparado en gran escala (test y control).



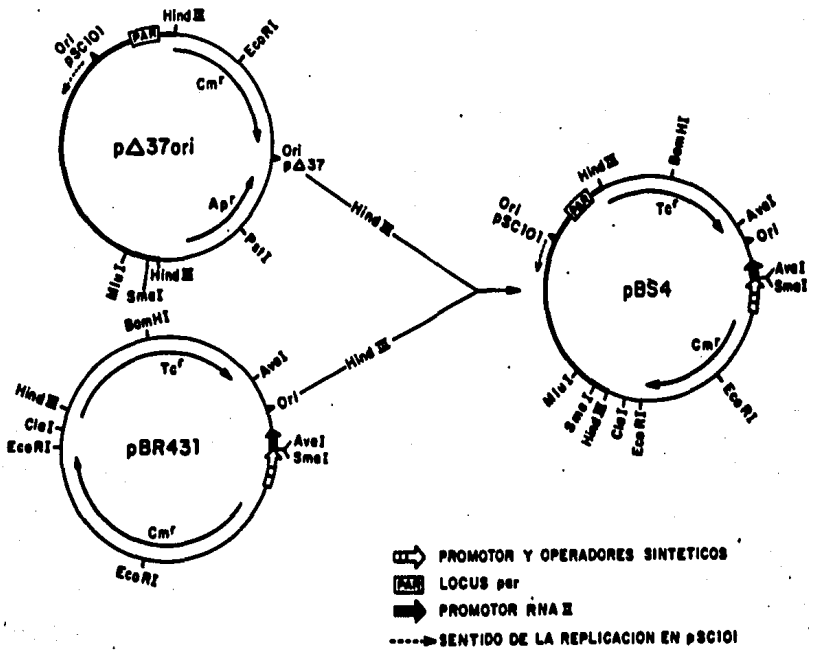


Fig 9. Representación diagramática de la construcción del pBS4. Los plásmidos pΔ37ori y pBR431 fueron totalmente digeridos, y el DNA resultante fue mezclado y tratado con ligasa T4 de DNA. La mezcla ligada se usó para transformar una cepa de *E. coli* polA to a la temperatura restrictiva (42°C).

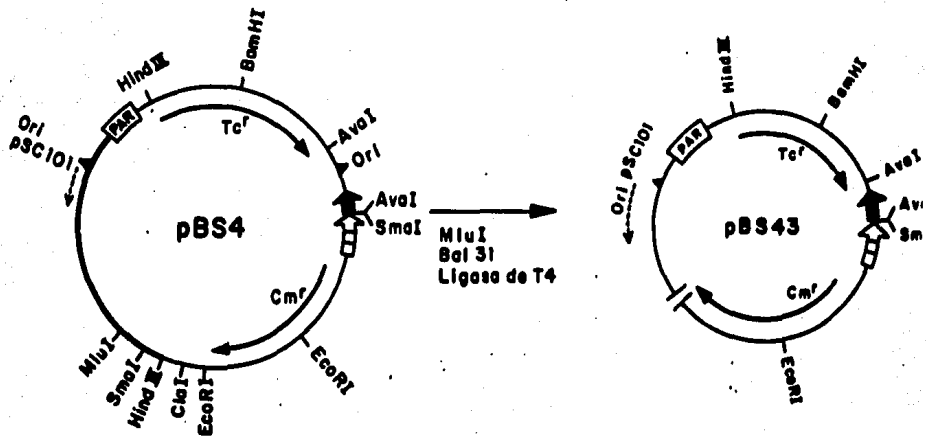
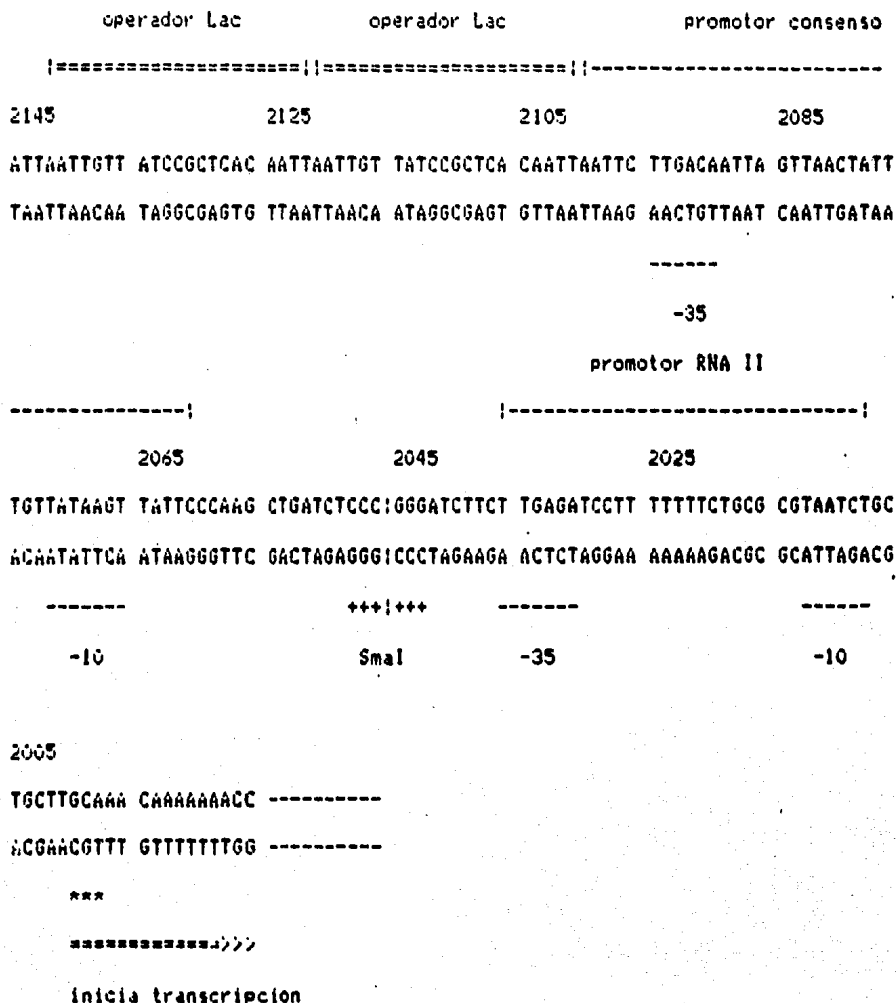


Fig 11. Representación diagramática de la construcción de pBS43. La simbología es la misma que en la Fig 9. El plásmido pBS4 fue linealizado con MluI y expuesto a Bcl31. El DNA resultante fue tratado con ligasa T4 de DNA. Con la mezcla de ligasa se transformó una cepa de



pD 54 y

Fig 10. Promotor del RNAlI y secuencias downstream en pBS43. Las coordenadas son las mismas que en pBR431. |=| y |=| indican la longitud de los fragmentos que contienen a los operadores y promotor sintéticos. ++ SmaI es un sitio de restricción único. \*\*\* señalan los sitios posibles para inicio del RNAlI. ==>> indica el sentido de la transcripcion.

RNA II (fig 10). Este promotor accesorio es un fragmento sintetizado in vitro (54), de 42 pb y su secuencia nucleotídica es muy cercana a la secuencia consenso derivada estadísticamente por Rosenberg y Court (53). No se conoce otro promotor que compita tan eficientemente por la polimerasa de RNA en presencia de un exceso de KCl. En el pBR431 y en el pBS4 este promotor está antecedido por un par de operadores sintéticos diseñados de acuerdo a la secuencia del operón lac (55). La localización de los operadores en estos plásmidos es un tanto peculiar, ya que en la naturaleza se observa un solo operador sucediendo al promotor del operón Lac. No obstante su ubicación, la replicación responde a la inducción y represión desde este promotor sintético (56).

La posibilidad de estimular la transcripción del RNA II (y en consecuencia de la replicación) con un activador gratuito como el IPTG (isopropiltiogalactosido), incrementara la posibilidad de obtener plásmidos super-replicones letales (ver sistema experimental), en el momento que se desee expresar el fenotipo producido por los plásmidos mutantes.

### V.3 Construcción del plásmido pBS43

El pBS4, incluye todos los requisitos propuestos (ver sistema experimental), excepto que no tiene un sitio único de restricción entre el promotor sintético y el promotor del RNA II. En esta pequeña región hay un sitio para la enzima SmaI; otro está incluido en el fragmento derivado del pSC101 (fig 9), sobre una zona dispensable. Para eliminar este último sitio, el pBS4 fue digerido con la enzima HhaI y tratado con la exonucleasa Bal31 (ver materiales y métodos). El DNA fue recircularizado con ligasa de T4 para luego transformar la

cepa p01 pts de E. coli bajo la presión selectiva siguiente: crecimiento a 42°C, en presencia de cloramfenicol.

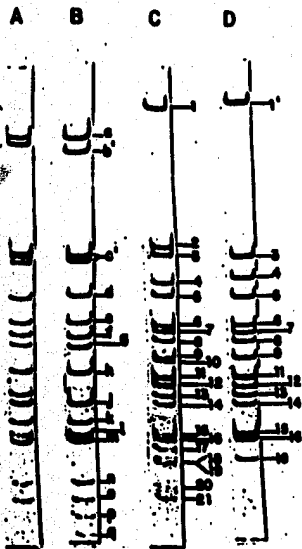
Se denominó pBS43 a un plásmido, aproximadamente de 5500pb, derivado del pBS4 y que ha sufrido la deleción aproximadamente de 1000 pb en una región dispensable entre el gen de resistencia a cloramfenicol y el origen de replicación del pSC101 (fig 11). Los cambios más interesantes con relación a los sitios de restricción son los siguientes (las coordenadas de posición se señalan en pb):

presentes en pBS43 (sitios únicos)	ausentes en pBS43
HindIII - 30	EcoRI - 3533
SmaI - 2045	ClaI - 3559
EcoRI - 2690	HindIII - 3564
	SmaI - 3696
	HluI - 3840
	NaeI - 4364

El pBS43 y el pBS4 fueron tratados con las enzimas de restricción anteriores. Los patrones observados junto a los de HpaII y HaeIII (fig 12) permitieron estimar los límites de la deleción producida (fig 14). Cabe enfatizar que en el pBS43 han sido quedado los siguientes sitios únicos de restricción: SmaI, EcoRI y HindIII.

#### V.4 Estrategias experimentales para producir deleciones unidireccionales.

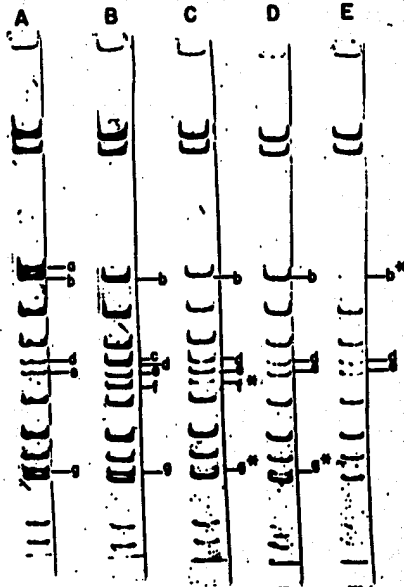
Para producir deleciones unidireccionales se han practicado dos estrategias diferentes: 1) en una, el pBS43 después de ser linealizado con SmaI, se expone a la actividad de exonucleasa 3' a 5'



TAMAÑOS

	pBS43	pBS4	pBS43
b'	<188	1	2272
		2	439
c'	391	3	422
	434	4	309
		5	288
		6	238
		7	219
		8	217
		9	190
		10	180
		11	160
		12	160
		13	147
		14	145
		15	128
		16	123
		17	92
		18	90
		19	89
		20	81
		21	76
			73
			62
			58

Fig. 43. Modificación en pH de las unidades 7, 8, 9, 10 y 11 del RNA pBS43. El RNA pBS43, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 8, se modifica en la unidad 7, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 7, en la unidad 8, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 6, en la unidad 9, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 5, en la unidad 10, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 4, en la unidad 11, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 3. Las unidades 7, 8, 9, 10 y 11 del RNA pBS43, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 8, se modifican en la unidad 7, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 7, en la unidad 8, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 6, en la unidad 9, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 5, en la unidad 10, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 4, en la unidad 11, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 3. Las unidades 7, 8, 9, 10 y 11 del RNA pBS43, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 8, se modifican en la unidad 7, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 7, en la unidad 8, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 6, en la unidad 9, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 5, en la unidad 10, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 4, en la unidad 11, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 3.



TAMAÑOS

a	391
b	434
c	212
d	222
e	234
f	179
g	92

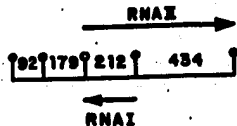
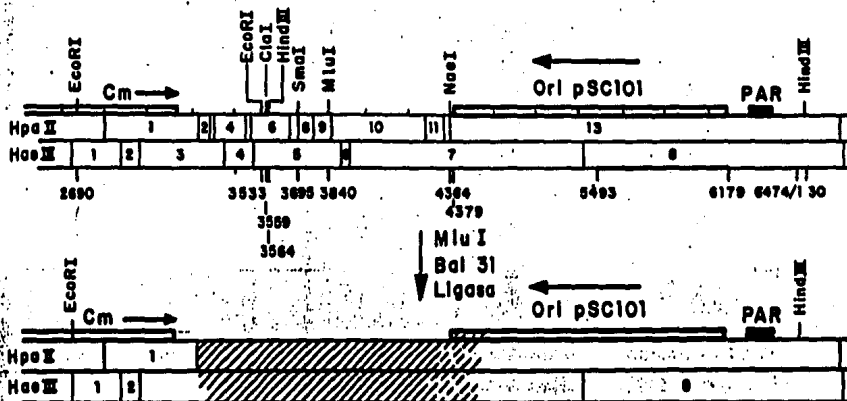


Fig. 43. Modificación en pH de las unidades 7, 8, 9, 10 y 11 del RNA pBS43. El RNA pBS43, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 8, se modifica en la unidad 7, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 7, en la unidad 8, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 6, en la unidad 9, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 5, en la unidad 10, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 4, en la unidad 11, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 3. Las unidades 7, 8, 9, 10 y 11 del RNA pBS43, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 8, se modifican en la unidad 7, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 7, en la unidad 8, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 6, en la unidad 9, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 5, en la unidad 10, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 4, en la unidad 11, cuando se prepara en presencia de un tampón de pH 3.



FRAGMENTOS PRESENTES EN pBS4

Hpa II		Hae III	
1	422	1	222
2	58	2	87
3	15	3	392
4	145	4	130
5	26	5	410
6	180	6	38
7	35	7	1188
8	62	8	1537
9	73		
10	439		
11	81		
12	15		
13	2272		

FRAGMENTOS PRESENTES EN pBS43

Hpa II		Hae III	
1	422	1	222
13	≈ 2272	2	87
		7	< 1188*
		8	1537

Fig. 14. Estimación de la cantidad de clones crecidos en el pBS4. Se usó un sistema de líneas diagonales. Las líneas horizontales indican los sitios de restricción para HpaII y HaeIII. Los fragmentos de restricción se han numerado y se muestra su posición en forma de líneas. En el gráfico solo se indican los sitios de restricción claramente observables. En algunos casos de la detección puede haberse observado, pero este sistema que la detección se encuentra más lejos de la posición 439 (según el sistema de restricción de HaeIII, en el material). Por otro lado, el fragmento 7 debe confundirse con el número 1 de HaeIII, generando un fragmento de gran tamaño (Fig. 13) el fragmento 13 se debe fraccionar con el 1 de HaeIII, produciendo un fragmento de tamaño indistinguible en este gel. Del fragmento 13 de pBS4. Por otro lado, el primer fragmento resultante de HpaII, en un sistema con el HaeIII de 1537, que va de 439 a 6179 en el pBS4, probablemente el sistema de la detección está muy próximo a la posición - 4379.

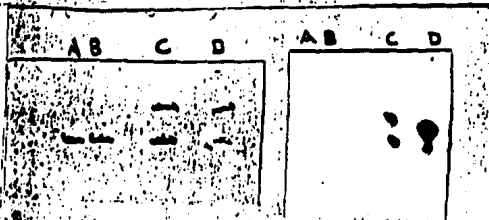


Fig. 15. Gel de agarosa al 1% que muestra la separación de la clonación en un sistema lineal, por medio de un sistema de líneas diagonales con un sistema. A la izquierda se muestran los resultados obtenidos con el sistema pBS4 vs. un sistema A) pBS43 linealizado B) 10:1; C) 1:10; D) 1:70. La línea de base con HaeIII. A la derecha se muestra la autorradiografía del mismo gel. El sistema de líneas fue marcado radiactivamente de 32P-DATP, suceso de ser el

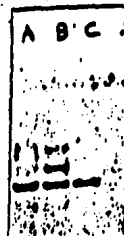


Fig. 17. Creación de un sitio de PstI. Gel de agarosa 1% que muestra la dimensión como en la Fig. 16; A) un sistema de líneas con PstI; B) sin PstI; C) pBS43 linealizado. Nota que en esta preparación se pueden ver también clones, posiblemente por un tratamiento insuficiente con HindIII.

```

                2065                               SmaI      2045
n)  ----- TATTCCCAAG CTGATCTCCC           :   GGGATCTTCT TGAGATCCTT -----
      ----- ATTAGGGGTTG GACTAGAGGG           CCCTAGAAGA ACTCTAGGAA -----

```

```

                2065                               Klenow + dGTP
B)  ----- TATTCCCAAG CTG                   :   GGGATCTTCT TGAGATCCTT -----
      ----- ATTAGGGGTTG GACTAGAGGG           GAAGA ACTCTAGGAA -----

```

```

                2065                               Oligomero + Ligasa
C)  ----- TATTCCCAAG CTGATCTCCCTGCA       :   GGGATCTTCT TGAGATCCTT -----
      ----- ATTAGGGGTTG GACTAGAGGG           GAAGA ACTCTAGGAA -----

```

Dimerización favorecida por la relación molar plásmido vs. oligomero

```

                2065                               ++++
D)  ----- TATTCCCAAG CTGATCTCCCTGCAAGGATCAG CTTGGGATA -----
      ----- ATTAGGGGTTG GACTAGAGGGGACCTCCCTAGTC GAACCCCTAT -----
                                     ++++                               2065

```

PstI

Fig 13. Autoprotección de un extremo de DNA linealizado. A) El pBS43 es linealizado con SmaI; B) el tratamiento con Klenow (exonucleasa 3 → 5) + dGTP genera un "gap" en cada extremo; C) solo a uno de estos, el oligonucleótido específico se ligara. Ahora quedara expuesto un extremo cohesivo, el otro extremo sera no-ligable; D) si la relación molar entre el oligomero y el plásmido es adecuada en la mezcla de ligasa, se formara un dimero lineal referencialmente. +++ señala un sitio de PstI.

de Klenow. La digestión es detenida en un sitio preciso, dado que a la mezcla de reacción se adiciona dGTP (fig 15-B). El producto de esta reacción es ligado a un oligonucleótido, undecamero sintético (5'-ATCTCCCTGCA-3'), de tal manera que 7 de sus nucleótidos se aparean precisamente a uno de los extremos, 5' salientes. Los 4 nucleótidos restantes quedan libres como un extremo cohesivo, 3' saliente, tipo PstI (ver fig 15-C). El oligonucleótido y el pBS43 linearizado (tratado con Klenow) debe mezclarse en una relación molar que favorezca la producción del complejo molecular esquematizado en la figura 15-D. Este, consiste en un par de oligonucleótidos apareados por su extremo 3', mediante la unión covalente de dos plásmidos linearizados. Debe aclararse que los extremos no complementarios con el oligómero, no son ligables. De esa manera, pueden ahora ser producidas directamente las delecciones unidireccionales sobre la región del RNA II, usando la exonucleasa Bal31 (a partir de la posición 2045, hacia abajo, Fig 15-A,C). Esta enzima debe adicionarse a tiempos tales, que favorezca la degradación progresiva de la región del origen (fig 13, Mat. y Metodos). Los productos de la degradación podran ser digeridos con PstI para liberar los extremos protegidos. Para que estos extremos recuperan su estado original, las colas 3' salientes producidas por PstI pueden retirarse ocupando la actividad de una nucleasa de cadena sencilla como S1 o bien la misma Klenow en presencia de los cuatro dNTPs. Finalmente, los plásmidos podran ser recircularizados con ligasa 74 de DNA y replicados in vivo.

En este trabajo se ha demostrado que el undecamero sintético se liga eficientemente al plásmido, linearizado y tratado con la actividad exonucleolítica de Klenow + dGTP. Se probaron diferentes relaciones



molares de plásmido linearizado vs. oligonucleótido, tales como 1:0.2, 1:10, 1:70 (fig 16) e inesperadamente la relación molar estimada como 1:70, rindió la mayor proporción de dímeros. Desconocemos si este exceso de oligonucleótidos se explique por algún problema en nuestra preparación sintética, como la presencia de impurezas, la cuantificación imprecisa de la concentración del undecámero (por la presencia de oligonucleótidos inconclusos, y/u otros residuos que absorban luz en el rango de 260 nm), o quizá sea un requerimiento para aparear con alta eficiencia el oligonucleótido al plásmido linearizado en nuestras condiciones de reacción (temperatura ambiente, amortiguador, etc). Por otro lado, se demostró que PstI encuentra su sustrato en el producto de la reacción de ligasa entre el undecámero y el vector (fig 17).

En los controles realizados se observó lo siguiente: a) el oligonucleótido marcado radioactivamente, no se liga inespecíficamente al plásmido linearizado, si este no ha sido tratado con Klenow + dGTP previamente; b) el tratamiento de exonucleación con Klenow + dGTP debe ser suficientemente prolongado (ver mat. y métodos). De no ser así, muchos extremos no son alcanzados por la enzima, y al ligar el producto de esa reacción con el oligonucleótido quinado se generan otros multímeros adicionales al dímero esperado; c) la adición del undecámero (hasta 13 pmolas, en una relación molar de 1:70) a una reacción de pBR322 con PstI, no inhibe aparentemente su digestión (datos no mostrados).

Esta estrategia experimental no ha sido empleada hasta ahora para obtener plásmidos deletados.

2) en la otra estrategia, el pBR43 luego de su linearización con

SmaI, se trata con Bal31. La digestión es detenida en solución "stop mix" (vona 50%, azul de bromofenol 0.5% y xilencianol 0.5%) y aplicada a un gel de agarosa de bajo punto de fusión. El DNA de alto peso molecular es recuperado del gel (mat y métodos).

El extremo que incluye al promotor sintético (desde la posición 2044, hacia arriba) es reintegrado, al recambiar un fragmento obtenido del pB545 con SmaI y EcoRI (de la posición 2044 a la 2700) por su homólogo semi-degradado. Para esto, el plásmido lineal tratado con Bal31 se digiere con EcoRI (y FvuII, para seccionar y dificultar la reconstitución de este fragmento), posteriormente en una mezcla de ligasa se adiciona un exceso molar del fragmento íntegro. Finalmente, el par de bases en la posición 2044 quedara ligado a los diferentes extremos generados (hacia abajo), en plásmidos circulares.

En los primeros ensayos practicados con esta estrategia, el DNA obtenido se utilizo para transformar E. coli gda ts a 42°C, en Cm. Hasta ahora no se ha identificado ninguna transformante que replicada a 30°C con y sin IFT6 muestre los fenotipos esperados (crecimiento claramente disminuido o nulo). No obstante, se eligió al azar una serie de colonias y se extrajo el DNA de plásmido, así fueron localizadas varias deleciones, la mayoría de ellas aparentemente bidireccionales, entre las que se cuentan, por lo menos; una deleción que no alcanzo el promotor del RNA II, una que elimino parte del RNA II, y otra deletó mas allá del RNA II. La deleción que se internalizo en la zona del RNA II, fué caracterizada mas cuidadosamente y se encontro que se habia perdido entre 91 y 139 pb del extremo 5' del RNA II. Se observo que el plásmido con esta deleción aparentemente no se amplifica a 30°C. Por otro lado, en caso de ser capaz el origen mutado, de producir al menos una copia por célula/por generación,

podria este plasmido sostener el crecimiento de transformantes en bajas concentraciones de Cm. Para probar esto, fue deletado el origen de pSC101, y el resto de la molecula fue ligado. Por el momento no se han aislado transformantes con este DNA.

Tambien se localizaron otros plasmidos mutados que requieren una caracterizacion cuidadosa. Por ahora el patron de Hae III revela que se ha perdido el fragmento que incluye el sitio de SmaI (351pb, fig 15A y B) y los que continuan hacia abajo hasta la zona del gene estructural de resistencia a Tc. Estos plásmidos han perdido todo el E1a II, sin embargo son interesantes ya que aparentemente son las primeras deleciones unidireccionales que hemos obtenido.

## VI -Discusion

En este trabajo se ha montado un sistema experimental que facilitara la produccion de deleciones unidireccionales sobre la zona del origen de replicacion (tipo ColEI) del pBS43. Este plásmido incluye el origen de pSC101, capaz de replicarlo en una cepa de Escherichia coli ts, a la temperatura restrictiva. Fue demostrado que plásmidos derivados de pBR322 en estas condiciones no son capaces de sostener el crecimiento bacteriano, en presencia de los antibioticos adecuados en concentraciones estandar. El mismo pBS43 replicado a 42°C no se amplifica aparentemente. De esta manera puede verse que la cepa polA ts utilizada, debe permitir bloquear temporalmente la replicación desde ori tipo ColEI del pBS43, para luego determinar la magnitud de la deleción creada y el fenotipo producido (en algunos casos esta pudiera inhibir el crecimiento bacteriano).

Cabe señalar que la cepa polA ts utilizada, aun cuando no permita la replicación significativa de plásmidos como el pBR431 a 42°C, el DNA cromosómico parece replicarse eficientemente (dependiente de polimerasa I). Ya ha sido propuesto que otras mutantes, polA1 ("mutación nonsense") y polA12 ts ("missense"), esta última a 42°C, pueden producir un reducido número de moléculas normales de polimerasa I, si en transcripción la base mutada es mal leída o saltada (mis reading o read through); suficientes para cumplir con la función esencial de replicación cromosómica, pero sacrificando la viabilidad de replicones, o funciones como reparación y recombinación entre otras.

Al construir el pBS4, se observó que las dos orientaciones del origen

de pSC101, con respecto a ori de pBR431 eran factibles. En caso de darse la replicación simultáneamente desde los dos replicones (en el mismo sentido, o en sentido contrario), podría verse afectado desfavorablemente el número de copias. Sin embargo esto no parece ocurrir, ya que las observaciones hechas por Cohen et al. (52), sobre la replicación de un plásmido similar al pB54 (con los replicones en el mismo sentido), apoyan un modelo de replicación que involucra el control negativo del inicio de replicación en ambos replicones. De acuerdo a este, un plásmido de bajo número de copias como el pSC101, será inhibido a bajas concentraciones de su represor específico, mientras que mayores cantidades de represor se requerirán en caso de un plásmido de alto número de copias (tipo ColE1). Consecuentemente, en un plásmido como el pB54, la replicación será controlada por el origen de pBR431 (en presencia de polimerasa I), y no será relevante la orientación del otro origen, ya que prácticamente estará inactivado. Por otro lado, en esta construcción se logró la reconstitución funcional del promotor de tetraciclina, en las dos orientaciones del inserto portador del origen de pSC101 y del locus par (determina la partición eficiente del pSC101 en la división celular).

En el caso de pB543 se deletó prácticamente todo el DNA entre el origen de pBR431 y el origen de pSC101, dejando solamente el sitio único y el origen de pSC101 (fig. 1). El fragmento de DNA que se eliminó incluía el fragmento mínimo anclado, que incluye el locus par, y se situó un sitio único (4875) inmediatamente adyacente al locus par. Este sitio único, en forma de secuencia de reconocimiento para el sitio del EcoRI, se usó para la construcción de plásmidos recombinantes. Como se puede observar en el autoradiograma, los plásmidos recombinantes se replicaron y se dividieron satisfactoriamente. Por otro lado, no pareciera haberse afectado la partición eficiente de pSC101 en la división celular.

Al caracterizar el pB543 se pudo notar en la fig 13A, que la banda de 191 pb tiene una migración anómala. Al ser dividida por Sma I (fig 13B), se mantiene al menos un fragmento de 212 pb igualmente anómalo en su migración. Este último fragmento incluye al RNA I y el extremo 5' del RNA II, es posible una relación entre la abundancia de secuencias invertidas repetidas en esta zona y su movilidad electroforética peculiar.

Se propusieron dos estrategias para generar las delecciones unidireccionales sobre el pB543. En una, dos plásmidos linearizados se ligaron eficientemente (cabeza con cabeza) por medio de un par de undecámeros sintéticos, generando dímeros lineales (fig 14) susceptibles de ser tratados por una exonucleasa. Se demostró que el par de oligonucleótidos enlazadores generan un sitio de PstI y al ser digerido este, se recuperan los monómeros originales (fig 15).

Deben hacerse notar dos situaciones un tanto inesperadas en la utilización del undecámero sintético: a) se esperaba que la relación molar necesaria para lograr con buena eficiencia la producción de dímeros, no fuera como la encontrada en la fig 14 (1:70). Para explicar la elevada cantidad aparentemente necesaria de oligonucleótido (véase que en la relación molar 1:0.2, prácticamente no se ve al undecámero ligado. El plásmido tratado con Klenow no se multimeriza per se, fig 14 carril B), es posible argumentar que su preparación tenga impurezas que inhiben su apareamiento (o que absorban luz a 260 nm) con el plásmido, o residuos sintéticos que compitan por el sitio blanco. También es factible que en las condiciones de reacción de ligasa practicadas el undecámero no se establece eficientemente para ser unido al plásmido. La temperatura media de fusión en la región del undecámero apareada al extremo

blanco de pB343, es aproximadamente de 18°C y la mezcla de ligasa se hizo a temperatura ambiente. Por ahora no se han hecho las pruebas necesarias que indique si una o las dos propuestas (u otra diferente) estan involucradas; b) dado que el extremo 3 del undecamero es palindrómico, existe la posibilidad de ligar dos oligonucleótidos en el extremo susceptible del plásmido. Esto inhibiria la dimerización, ya que el extremo 5 libre del segundo undecamero ligado no es cohesivo. Llego a ensayarse una relacion molar plásmido:oligo hasta de 1:200 y no se observo un incremento del estado monomérico con respecto a la relacion molar 1:70 (la eficiencia de dimerización fue muy similar). Por el momento no se tiene una explicación satisfactoria.

De cualquier manera, esta estrategia experimental, podria ser aplicada en otros plásmidos o fagos para exponer específicamente uno de los extremos de la molecula linealizada a diferentes tratamientos. En cada caso, sera necesario diseñar el oligonucleótido sintético que mejor se adapte al sitio que quiera manipularse.

La segunda estrategia propuesta, implica degradar los dos extremos generados por SmaI y posteriormente reconstituir uno, cambiando el extremo reducido por uno integro, aislado previamente. La abundancia de deleciones bidireccionales hasta ahora obtenidas puede estar reflejando, un manejo inapropiado del DNA (como puede ser, una digestión insuficiente con EcoRI para retirar el extremo reducido no deseado, o la adición del fragmento (SmaI-EcoRI) integro, en una cantidad que no compita eficientemente con el fragmento reducido). Por otro lado puede ser un indicio de que nuestra cepa polA ts no sea capaz de mantener visibles ciertas mutaciones unidireccionales en el

interior del origen.

En uno de los plasmidos con deleciones bidireccionales en que se perdió una parte de la region que codifica al RNA II, fue separado in vitro el origen de  $\rho$ C101 del origen mutado. La recuperacion in vivo de un plasmido replicado solamente por el origen mutado, no ha sido posible.

Aun cuando la deleccion bidireccional elimino el promotor sintético y sus operadores, parece factible la transcripcion que requiere la zona del origen desde el promotor  $\rho$ C, situado 40+/- pb hacia adelante del promotor de  $\rho$ C (Rodriguez et al 1961). Desconocemos si nuestros intentos infructuosos para aislar el origen mutado se deban a defectos experimentales, o a la incapacidad del origen mutado para mantener per se la replicación. La deleccion retiró el RNA I y posiblemente la mayor parte de la estructura IV (fig 4B). Se ha sugerido que la reduccion de la estabilidad de la estructura IV, afecta la formación del hibrido DNA-RNA guiando a la formación ineficiente del primero.

Hasta ahora no se han aislado mutaciones unidireccionales dentro de la zona del origen de replicacion tipo  $\rho$ 1 E1, pero creemos que el sistema experimental montado en este trabajo debe facilitar la obtencion de deleciones que remuevan secuencias asociadas a la regulacion de la replicacion tipo  $\rho$ 1 E1. Su caracterizacion en la cepa de E.coli  $\rho$ 1 A1s en las condiciones de crecimiento adecuadas, nos permitira saber si el sistema experimental es apto para hacer reducciones unidireccionales de la region del origen, que continúen permitiendo el inicio de la replicacion in vivo.



## VII -BIBLIOGRAFIA

- 1) O. Avery, C.M. McLeod, Mcarty. (1944). J. Expt. Med. 79,137-158. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types.
- 2) A.D. Hershey, H. Chase (1952). J.Gen.Physiol. 26,36-56. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage.
- 3) F.H.C. Crick. (1970). Nature. 227,561. Central dogma of molecular biology.
- 4) J.D. Watson, F.H.C. Crick (1953). Nature. 171,736-738. A structure for DNA.
- 5) J.D. Watson, F.H.C. Crick (1953). Nature. 171,964-967. Genetic implications of the structure of DNA.
- 6) E.E. Franklin et.al. (1953). Nature. 171,740. Molecular configuration in Sodium Thymonucleate.
- 7) H.H.F. Wilkins et.al. (1953). Nature. 171,738-739. Molecular Structure of Desoxyribose Nucleic Acids.
- 8) E. Chargaff. (1950). Experientia. 6,201-209. Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of their Enzymatic Degradation.
- 9) Meselson, F.U.Stahl. (1957). P.N.A.S. 44,671-687. The replication of DNA in E. coli.
- 10) W. Kornberg et.al. (1958). JBC.233,163.
- 11) T. Okasaki, R. Okasaki (1968). CSHSQB. 33,129-144. In vivo mechanism of DNA chain growth.
- 12) F. Gustafsson, E. Nordstrom(1980). J.Bact. 141,106-110. Control of replication in shifts between different copy number levels.

- 13) S. Cohen et.al. (1973). PNAS. 70,3240-3244. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro.
- 14) Hershfield, V., Boyer, H.W., Yanofsky, C., Lovett, M.A., Hellinki, D.R. (1974). P.N.A.S. 71,3455-3459. Plasmid Col E1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA.
- 15) Clewell R. (1973). J.Bact. 110,667-676. Nature of Col E1 Plasmid recombination in the Presence of Chloramphenicol.
- 16) Bolivar F., Rodriguez R., Greene H.C., Betlach, H., Heyneker, H.L., Boyer, H.M., Cross, J., Falkow S. (1977). Gene, 2, 95-113. II. Construction and characterization of new cloning vehicles, A multipurpose cloning system.
- 17) Bolivar F.. Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant molecules. Gene, 4 (1978) 131-136.
- 18) Soberon X., Covarrubias L., Bolivar F., Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. Gene, 9 (1980) 287-305.
- 19) Warren, G.J., Tuigg, A. and Sherratt, D.J., ColE1 plasmid mobility and relaxation complex, Nature, 274. (1978) 259-261.
- 20) Warren, G.J., Saul, H.W. and Sherratt, D.J., ColE1 plasmid mobility: Essential and conditional functions.. Mol. Gen. Genet., 170 (1979) 103-107.
- 21) Betlach, H.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M. and Boyer, H.W.. A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA, Fed. Proc., 35 (1976) 2037-2045.
- 22) G.Selzer, T.Som, T.Itoh y J.Tomizawa. (1983). Cell. 32,119-129.

The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids.

23) Tomizawa et.al. (1977). Proc.Nat.Acad.Sci. 74,1865-1869. Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA.

24) T.Som , J.Tomizawa (1982). Mol.Gen.Genet. 182,375-383. Replication origin of plasmid RSF1030.

25) T.Itoh and J.Tomizawa. (1980). Proc.Nat.Acad.Sci. 77,2450-2454. Formation of a RNA primer for initiation of replication of Col E1 DNA by ribonuclease H.

26) Bolivar, F., Betlach, H., Heyneker, H.L., Shine, L., Rodriguez, E. and Boyer, H.U.. Origin of replication of pBR325 plasmid DNA. F.N.A.S., 74 (1977) 5265-5269.

27) Morita, H. and Oka, A. (1979). Eur.J.Biochem. 97,535-443. The structure of a transcriptional unit on colicin E1 plasmid.

28) Tomizawa et.al. (1981). Proc.Acad.Nat.Sci. 78,1421-1425. Inhibition of Col E1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA.

29) Tomizawa J., and Itoh T. (1981). Proc.Acad.Nat.Sci. 78,6096-6100. Plasmid Col E1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript.

30) Lacatena E.M. and Cesareni, G. (1981). Nature. 294,623-626. Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer transcript inhibits Col E1 replication.

31) Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberon, I., Blanco, A., Kupersztoc Portnoy, Y.M. and Bolivar F.: Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. Gene 13 (1981) 25-35.

ESTA TESIS NO DEBE SER REPRODUCIDA SIN EL CONSENTIMIENTO DE LA BIBLIOTECA

32) J. Tomizawa and T.Som. (1984). Cell. 38,871-878. Control of Col E1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein.

33) H. Masukata and J.Tomizawa. (1984). Cell. 36,513-522. Effects of point mutations on formation and structure of the RNA primer for Col E1 replication.

34) Davidson J. (1984). Gene. 28,11-15.

35) Supplement to DNA Replication. A. Kornberg. Edición 1982. W.H.Freeman and Company.

36) Tomizawa and Itoh (1982). Cell. 31,575-583. The importance of RNA secondary structure in Col E1 primer formation.

37) Lacatena R.H., Cesareni, G.(1983). J.Mol.Biol. 170,635-650. Interaction between RNA I and the primer precursor in the regulation of Col E1 replication.

38) Tamm. Polisky (1983). Nucl.Acids.Res. 11,6361-6397. Structural analysis of RNA molecules involved in plasmid copy number control.

39) Tomizawa J. (1984). Cell. 38,661-670. Control of Col E1 plasmid replication: The Process of binding de RNA I to the Primer Transcript.

40) Wong E. H., Polisky B. (1985). Cell. 42,959-966. Alternative Conformations of the Col E1 Replication Primer Modulate Its Interaction with RNA I.

41) Boyer H. W., Doussoux E. (1969). J.Mol.Biol. 41,459-472. A complementary Analysis of the Restriction and Modification of DNA in E. coli.

42) Zurita H., Bolivar F., Soberón X. (1984). Gene.28,119-122. Construction and characterization of new cloning vehicles. VII. Construction of plasmid pBR327<sub>par</sub>, a completely sequenced, stable

Derivativa de pBR327 containing the par locus de pSC101.

- 43) Taylor L.A., Bachmann B.J. Low B. (1976). Bacteriological Reviews. 40,11c-1e7.
- 44) Luria S.E., Delbruck H. (1943). Genetics. 26,491-511. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance.
- 45) Birnboim H.C., Doly J. (1979). Nucleic Acids Res. 7:1513. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
- 46) Bolivar F., Rodriguez R., Betlach M., Boyer H.W. (1977). Gene. 2,75-93. Construction and characterization of new cloning vehicles, 1. Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB5.
- 47) Itoh H., Ito, Y., Ikuta S., Itakura K. (1982). Nucl.Acids.Res. 10,1755-1769
- 48) De Lucia F., Cairns J. (1969). Nature. 224,11e4-11e6. Isolation of an E. coli Strain with a mutation affecting DNA polymerase.
- 49) Monk, H., Kinross, J. (1972). J.Bacteriol. 109,971-978. Conditional Lethality of recA and recB Derivatives of a Strain Escherichia coli K-12 with a Temperature-Sensitive Deoxyribonucleotic Acid Polymerase I.
- 50) Tesis de Maestria en I.I.B.M. I. B. Castaño Navarro (1986), U.N.A.M., Aislamiento y Caracterización de mutaciones que afectan la síntesis de 600nT en E. coli.
- 51) Ueyemura D., Lehman I.R. (1976). J.Biol.Chem. 251,4078-4084. Biochemical Characterization of Mutant Forms of DNA Polymerase from Escherichia coli.
- 52) Cabello, F., Timmis, K., Cohen, S.N. (1976). Nature. 259,285-290. Replication control in a composite plasmid constructed by in vitro linkage of two distinct replicons.
- 53) Rosenberg H. Court D. (1979). Ann.Rev.Genetic. 13,319-353.

54) Scheraga H., Rossi J., Larson G. Itakura K. Promoters, Structure and

Function. Fraeger Scientific, New York, 1982. pp.407-431.

55) Rossi J. enviado a publicación.

56) Zurita M. Tesis de Licenciatura. UNAM. Construcción y caracterización de vehiculos moleculares de clonación para el estudio de la transcripción.

VIII - APENDICE

ATP	TRIFOSFATO DE ADENOSINA
bm	GASES DE MOVILIZACION
cm	CLORAMFENICOL
CsCl	CLORURO DE CESIO
dGTP	TRIFOSFATO DE DEOXIGUANOSINA
dNTP	TRIFOSFATO DE DEOXINUCLEOSIDO, O DEOXINUCLEOTIDO
D.O.	DENSIDAD OPTICA
E. coli	Escherichia coli
M	MOLAR
ng	NANOGRAMOS
ori	ORIGEN DE REPLICACION
par	LOCUS DE PARTICION DE $\rho$ SC101
pb	PAIRES DE BASES
PI	IODURO DE PROPIDIO
pop	REPRESOR DEL PRIMERO DE REPLICACION
rpm	REVOLUCIONES POR MINUTO
Sp	ESPECTINOMICINA
Tc	TETRACICLINA
ug	MICROGRAMO
ul	MICROLITRO