

**REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FISICAS Y NATURALES**

**UN NUEVO MECANISMO DE INICIACION
DE LA REPLICACIÓN DEL DNA
MEDIANTE PROTEINA TERMINAL**

DISCURSO
LEIDO EN EL ACTO DE SU RECEPCION
POR LA

EXCMA. SRA. DÑA. MARGARITA SALAS FALGUERAS

Y
CONTESTACION
DEL

EXCMO. SR. D. ANGEL MARTIN MUNICIO

EL DIA 25 DE MAYO DE 1988



MADRID
Domicilio de la Academia
Valverde, 22

Depósito Legal: M-18241-1988

Fotocompuesto e Impreso por: Gráficas Lucentum, S. A. - Saturnino Calleja, 6 - 28002 Madrid - 1988

DISCURSO
DE LA
EXCMA. SRA. DÑA. MARGARITA SALAS FALGUERAS

Excmo. Sr. Presidente,
Excmos. Sres. Académicos,
Señoras y Señores:

Es para mi un gran honor el haber sido nombrada miembro de esta Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y quisiera expresar mi agradecimiento por la confianza que se me ha otorgado con este nombramiento. Es un motivo de gran satisfacción el estar hoy aquí y poder colaborar en el futuro en las tareas de esta Real Academia.

Sin embargo, la alegría de este momento se ve totalmente empañada por la enorme tristeza que me produce el recordar a nuestro querido amigo, el Excmo. Sr. D. David Vázquez Martínez, Académico que me precedió en la posesión de esta medalla, a quien quiero rendir un sentido homenaje de admiración y cariño.

David Vázquez, prematuramente fallecido hace poco más de dos años, el 15 de Febrero de 1986, reunía tres cualidades que es difícil encontrar en una misma persona: gran investigador, gran maestro y gran humanidad.

El nombre de David Vázquez ha estado asociado al conocimiento del mecanismo de acción de los antibióticos. De hecho, él era uno de los investigadores más destacados internacionalmente en dicho campo. No hubo Congreso o Reunión Internacional que tratase de un modo directo

o indirecto sobre los antibióticos en que David Vázquez no ocupase un lugar de invitado destacado y era también constantemente reclamado para impartir seminarios y cursos sobre este tema apasionante, tanto desde el punto de vista básico como por sus repercusiones aplicadas, en el que David Vázquez era una figura preeminente. Sin embargo, las palabras que yo pueda decir en elogio de David podrían ser el gesto de mi cariño y admiración hacia él. La realidad es lo que cuenta. Y aquí ha quedado la extraordinaria obra investigadora de David Vázquez con su impresionante curriculum de trabajos originales de investigación publicados en las más prestigiosas revistas internacionales.

David Vázquez, después de un período de especialización en varios centros extranjeros, entre los que yo destacaría el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, donde ya inició su importante contribución al conocimiento del mecanismo de acción de los antibióticos, volvió en 1966 a España, al Centro de Investigaciones Biológicas en Madrid, donde comenzó su extraordinaria y difícil labor de formar un prestigioso grupo de investigación, habida cuenta de los escasos medios con los que se contaba en España en aquellos años. Pese a ello, y luchando contra muchas dificultades, David Vázquez pudo realizar una investigación de gran calidad a nivel internacional y creó una escuela de discípulos distinguidos que hoy día ocupan lugares destacados en centros de investigación nacionales y extranjeros. Para ello, David tuvo que aunar su calidad de investigador excepcional con otra cualidad en la que también demostró su valía: para conseguir sus objetivos científicos, David tuvo que formar parte de órganos de Gobierno del Consejo Superior de Investigaciones Científicas como la Dirección del Instituto de Biología Celular, del Instituto de Bioquímica de Macromoléculas y, más tarde, del Centro de Biología Molecular.

Su cualidad de gran maestro ya la demostró David en la formación de un extraordinario número, en cantidad y calidad, de discípulos a la que aludía antes, creando una prestigiosa escuela sobre mecanismos de acción de los antibióticos. Pero además, David Vázquez fue maestro en la Universidad enseñando a varias generaciones de estudiantes la asignatura de Microbiología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Madrid, de cuya cátedra de Microbiología fue Director durante varios años. Esta tarea docente hizo también posible que David seleccionase los mejores estudiantes a partir del 3.^{er} año de la Licenciatura, que después se incorporarían a su grupo de investigación.

Finalmente, quisiera señalar la extraordinaria personalidad de David Vázquez. Era una persona extremadamente seria en su quehacer investigador, docente y administrativo pero, a la vez, sabía tomarse la vida con humor y sabía tratar del modo adecuado, tanto a sus compañeros de trabajo como a sus estudiantes en el laboratorio y en la Universidad. Todo el mundo le quería y apreciaba. Para mí, fue un gran amigo y un ejemplo a seguir en todo momento. Es para mí una tarea difícil y un honor el ocupar el sillón que fue de David Vázquez. Sólo espero ser una digna sucesora del gran investigador, maestro y amigo que fue David.

* * *

1. LA REPLICACION DEL DNA. ASPECTOS GENERALES

Este año se cumple el 35 aniversario de la publicación del trabajo de la doble hélice de Watson y Crick (1953). Como es bien conocido, en este trabajo se describe el DNA como una hélice de dos cadenas unidas por puentes de hidrógeno a través del apareamiento de bases, adenina con timina y guanina con citosina. Otra parte importante del trabajo fue la hipótesis atractiva que la complementariedad de los pares de bases de la estructura del DNA suministraba un sistema fácil para la replicación, proponiendo el mecanismo de replicación semiconservativo. Efectivamente, cinco años más tarde Meselson y Stahl (1958), en un trabajo clásico, demostraron la validez de la hipótesis de la replicación semiconservativa del DNA. Posteriormente se demostró que la replicación ocurre a partir de un origen fijo, el origen de replicación, en la dirección 5' a 3', y que, en la mayoría de los sistemas de replicación, es bidireccional, siendo continua en la llamada banda adelantada y discontinua en la banda retrasada, dando lugar a los llamados "fragmentos de Okazaki" (Kornberg, 1980).

La idea que se tuvo en un principio de la replicación era que una proteína, la DNA polimerasa, sería capaz de realizar el proceso. Sin embargo, pronto se descubrió que esto era una simplificación del problema. Por una parte, la primera DNA polimerasa que se descubrió, la que se conoce actualmente como DNA polimerasa I (Lehman y cols. 1958) de *E. coli* se vio que, por sus características enzimáticas, no podía ser el enzima implicado en la replicación del DNA *in vivo* y, mediante la obtención

de mutantes en esta polimerasa, los mutantes $polA1^-$ (De Lucia y Cairns, 1969) se pudieron descubrir otras dos DNA polimerasas en *E. coli*, la II (Knippers, 1970) y la III (Kornberg y Geffer, 1971). Posteriormente, mediante el uso de mutantes de *E. coli* sensibles a temperatura en replicación se demostró que la DNA polimerasa III es la polimerasa implicada en la replicación del DNA de *E. coli* y es el producto del gen *dna E* (Wechsler y Gross, 1971). Sin embargo, más tarde se encontró que la DNA polimerasa III es un enzima muy complejo, que requiere una serie de subunidades adicionales para conferir propiedades tales como procesividad, velocidad, actividad $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa, etc, que forman lo que se conoce como holoenzima de la DNA polimerasa III, cuya composición se muestra en la Tabla I (Kornberg, 1982). Así, por ejemplo, el núcleo de la PolIII tiene una procesividad baja, y es capaz de copiar solamente 10 a 15 residuos de nucleótidos antes de pararse, pudiendo rellenar solamente huecos cortos en el DNA. La PolIII' y la PolIII* tienen una procesividad de 40 y 190 residuos, respectivamente, mientras que el holoenzima de la polIII tiene una procesividad ilimitada aparentemente, >5000 residuos.

Tabla I.

Componentes del holoenzima de la DNA polimerasa III (Kornberg, 1982)

Subunidad	Peso molecular Kdaltons	Nombres alternativos
α	140	Proteína <i>dna E</i> o pol C
ϵ	27	—
δ	10	—
τ	78	—
γ	52	Proteína <i>dna Z</i>
δ	32	Factor III, proteína <i>dna X</i>
β	37	Factor I, copol III*, proteína <i>dna N</i>

Pol III
(núcleo) — Pol III' — Pol III*

Otro caso muy bien estudiado en que se han caracterizado proteínas accesorias a la DNA polimerasa es el del fago T4. Dichas proteínas permiten a la DNA polimerasa, producto del gen 43, replicar con una mayor velocidad y procesividad un molde de banda simple. Así, por ejemplo, el complejo formado por las proteínas 43, 44, 62, 45 y 32 replican de una

manera muy procesiva (>20.000 nucleótidos) a una velocidad 90 veces mayor que la de la DNA polimerasa sola (Huang y cols. 1981; Roth y cols. 1982). Además, cuando a estas cinco proteínas se les añade el complejo de otras dos proteínas, 41 y 61, la replicación se estimula aún más, debido a la actividad helicasa de la proteína 41 que a su vez es estimulada por la proteína 61 (Hinton y cols., 1987).

Otro caso en que se han caracterizado proteínas accesorias es el de la DNA polimerasa del fago T7. El gen 5 de T7 codifica a una proteína de 84.000 daltons que tiene una actividad DNA polimerasa baja, que se estimula mucho cuando se añade la tioredoxina de la célula huésped, formando ambas proteínas un complejo muy estable (Richardson y cols. 1987). Recientemente se ha demostrado que la tioredoxina confiere procesividad a la proteína producto del gen 5 (Tabor y cols. 1987). La proteína producto del gen 4 viral forma un complejo con la DNA polimerasa (proteína producto del gen 5/tioredoxina) y estimula la replicación produciendo desplazamiento de banda debido a la actividad helicasa de la proteína producto del gen 4 (Richardson y cols. 1987).

2. INICIACION DE LA REPLICACION DEL DNA

Una característica común de todas las DNA polimerasas conocidas es que son incapaces de iniciar cadenas de DNA, pudiendo elongar solamente a partir de un grupo 3'OH libre. Esto planteaba el problema de la iniciación de la replicación no solamente en el origen, sino también en cada uno de los fragmentos de Okazaki. Teniendo en cuenta este problema y la capacidad de las RNA polimerasas de iniciar cadenas de RNA, A. Kornberg postuló que la iniciación de la replicación podría tener lugar mediante la síntesis de un RNA iniciador por la RNA polimerasa. Efectivamente, se demostró que la replicación del DNA del fago M13, el paso de la banda simple a la forma replicativa de doble banda, es inhibida por rifamicina, que es un inhibidor conocido de la RNA polimerasa de *E. coli* (Brutlag y cols. 1971). Posteriormente se demostró que, efectivamente, la replicación del DNA de M13 requiere síntesis de RNA que precede a la síntesis del DNA (Wickner y cols. 1972). Sin embargo, más tarde surgió la paradoja de que la replicación del DNA de Φ X174 no era inhibida por rifamicina lo que indicaba que, o bien la replicación del DNA de Φ X174 no era iniciada por RNA, o que hay un mecanismo de síntesis de RNA que es resistente a rifamicina. Pronto se demostró que la síntesis del DNA de

Φ X174 también se inicia con RNA puesto que se encontró DNA unido al RNA iniciador (Shekman y cols. 1972), demostrándose posteriormente la existencia de una RNA polimerasa específica, la primasa, resistente a rifamicina (Kornberg, 1980).

Actualmente se conoce con bastante detalle el mecanismo por el cual se inicia la replicación de la banda simple del DNA de M13 y de Φ X174. En el caso del DNA de M13, éste se recubre por la proteína SSB (proteína que se une a DNA de banda simple) y a continuación la RNA polimerasa sintetiza un oligoribonucleótido iniciador corto en el sitio que corresponde al origen de replicación, que es usado por el holoenzima de la DNA polimerasa III para sintetizar la banda complementaria equivalente a la longitud unidad; finalmente, la DNA polimerasa I elimina el RNA y rellena el hueco, y la DNA ligasa cierra covalentemente el círculo (Kornberg, 1980).

La iniciación de la replicación del DNA de Φ X174 es mucho más compleja que la de M13. Una vez recubierto el DNA de Φ X174 con la proteína SSB, se unen una serie de proteínas celulares en el origen de replicación formando lo que se llama el "preprimosoma"; éstas son las proteínas dna B, dna C, i, n, n' y n". A continuación interviene la primasa, producto del gen dna G, que sintetiza el RNA iniciador que después será utilizado por la DNA polimerasa III para sintetizar la cadena complementaria. Como en el caso de M13, el RNA iniciador es eliminado, el hueco se rellena y se cierra covalentemente el círculo.

La iniciación de la replicación de plásmidos lineales tales como ColEI también se inicia mediante un RNA (Tomizawa y Selzer, 1979), y también los fragmentos de Okazaki, para la síntesis de la banda retrasada del DNA, utilizan un RNA como iniciador (Ogawa y Okazaki, 1980).

La Figura 1 muestra cómo la iniciación de la replicación por RNA da cuenta de la iniciación de los fragmentos de Okazaki en la llamada banda retrasada (Kornberg, 1982). Este mecanismo es muy similar al que tiene lugar en la iniciación de la replicación del DNA del fago Φ X174 que se describió anteriormente. Por otra parte, también se conoce con bastante precisión el modo como se inicia la replicación del cromosoma de *E. coli* mediante el aislamiento de una secuencia de tan solo 245 pares de bases (pb) de un total de 4×10^6 pb que constituyen el cromosoma de *E. coli*. Dicha secuencia, conocida como oriC, se ha clonado en un plásmido, y es capaz de iniciar la replicación en un sistema *in vitro* en un proceso bi-

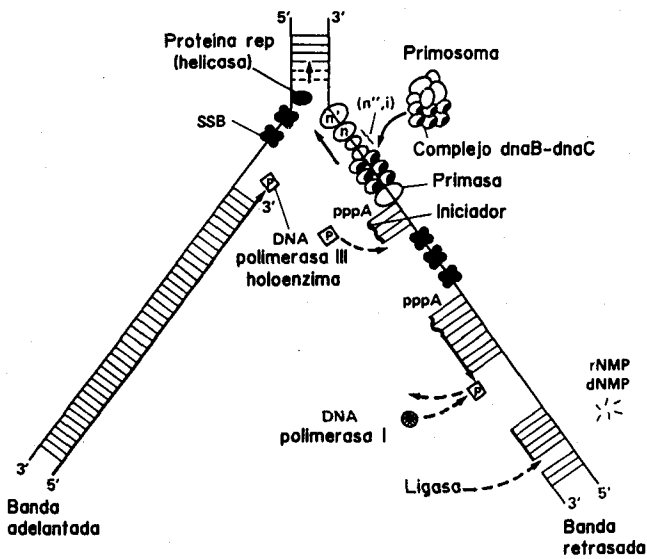


Figura 1. Crecimiento de la cadena de DNA en una de las bandas de un cromosoma de *E. coli* replicando bidireccionalmente (Kornberg, 1982).

direccional que se esquematiza en la Figura 2. La secuencia de *oriC* que tiene como característica notable contener 11 secuencias GATC, es reconocida por la proteína *dna A* y la proteína HU tipo histona que, en presencia de ATP a 38°C, forman un complejo inicial al que se unen posteriormente las proteínas *dna B* (con actividad helicasa) y *dna C*, también

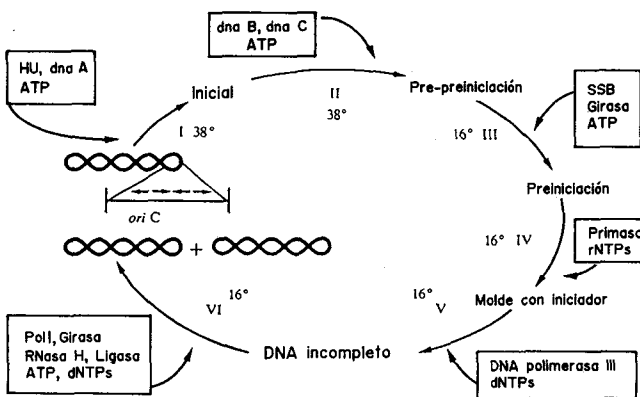


Figura 2. Esquema de replicación de plásmidos que contienen el *oriC* de *E. coli* (Kornberg, 1987).

en presencia de ATP a 38°C, para formar un complejo de pre-preiniciación. A continuación se unen la proteína SSB y la girasa, en presencia de ATP a 16°C, para formar el complejo de preiniciación. A este complejo se une la primasa a 16°C en presencia de los NTPs para formar el molde con el RNA iniciador que es elongado por la DNA polimerasa III en presencia de los dNTPs para dar lugar a DNA incompleto que, por la acción de la RNasa H, la DNA polimerasa I, la ligasa y la girasa, a 16°C, en presencia de ATP y los dNTPs, producen el DNA completo (Kornberg, 198).

Por otra parte, se ha propuesto recientemente un modelo, tanto para la replicación del cromosoma de *E. coli* por la DNA polimerasa III, como para la replicación del DNA del fago T4, en que el holoenzima en la horquilla de replicación forma parte de una estructura mayor, un replisoma, que estaría formado por helicasas para abrir la doble hélice, un primosoma para iniciar las cadenas nacientes y proteínas que se unen a DNA para facilitar la replicación. Además, hay evidencia reciente que sugiere la presencia de más de una molécula de holoenzima de la DNA polimerasa

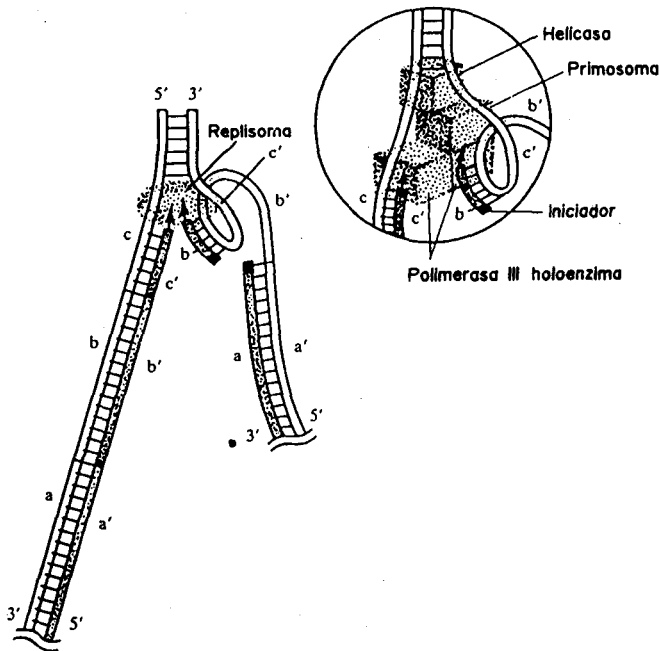


Figura 3. Esquema de replicación simultánea de ambas bandas del DNA por un replisoma (Kornberg, 1987).

III por replisoma, lo cual estaría de acuerdo con el modelo propuesto por A. Kornberg y B. Alberts (Kornberg, 1982) en que la síntesis continua de la otra banda (la banda retrasada) tiene lugar a la vez por dos moléculas de holoenzima de la DNA polimerasa III. Teniendo en cuenta que las bandas en un DNA de doble cadena tienen polaridad opuesta y la dirección de elongación de la cadena es única, 5' a 3', el modelo anterior supone que la banda retrasada debe estar curvada 180° como se muestra en la Figura 3.

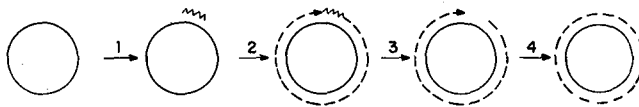


Figura 4. Esquema de iniciación de la replicación en un DNA circular de cadena única. La línea en zig-zag indica el RNA iniciador y la línea discontinua, el DNA sintetizado a partir de dicho RNA.

La Figura 4 muestra un esquema simplificado de la iniciación mediante RNA en un DNA circular de cadena simple. Por otra parte, como puede verse en la Figura 5, en el caso de un DNA lineal, cuya replicación se inicia en los extremos, el problema es cómo se completa el DNA después que el RNA iniciador es eliminado (Watson, 1972). Para resolver este problema los fagos T4 y T7 forman polímeros y el fago lambda circulariza su DNA por medio de los extremos cohesivos que contiene (Kornberg, 1980, 1982).

Otro mecanismo de iniciación de la replicación en el caso de DNAs circulares de doble cadena consiste en la rotura en una posición determinada del origen de replicación, que realiza una proteína específica en una de las dos cadenas del DNA, quedándose la proteína unida covalentemente al extremo 5' de dicha rotura y dejando el grupo 3'OH libre para que la DNA polimerasa elongue la cadena del DNA. Este mecanismo de iniciación de la replicación se descubrió por vez primera para la replicación de la forma replicativa del fago Φ X174 (Kornberg, 1980) y recientemente se ha demostrado que se utiliza también en la replicación de una serie de plásmidos de *B. subtilis* (Koepsel y cols. 1985). La Figura 6 muestra un esquema de dicho mecanismo de iniciación de la replicación para el caso del DNA del fago Φ X174 (Kornberg, 1982). La proteína producto del gen A viral es la que cataliza la rotura del enlace entre los residuos 4297 y 4298 formando un enlace covalente con el grupo 5' fosfato en el

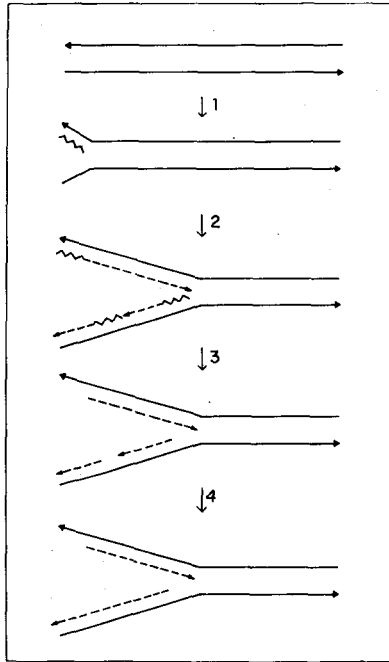


Figura 5. Esquema de iniciación de la replicación en un DNA lineal de doble cadena. La línea en zig-zag indica el RNA iniciador y la línea discontinua, el DNA sintetizado a partir de dicho RNA.

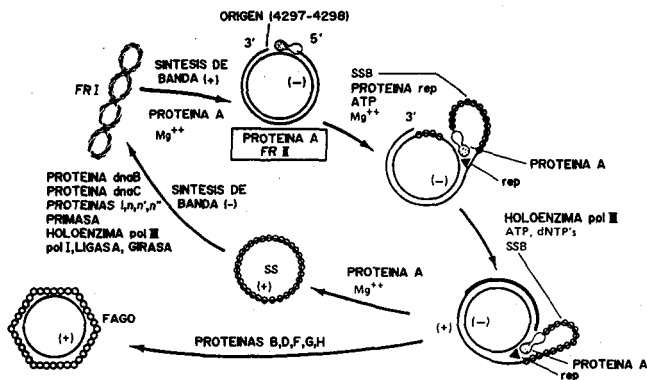


Figura 6. Esquema de replicación de la forma replicativa del DNA de $\Phi X174$ (Kornberg, 1982).

sitio hidrolizado. A continuación forma un complejo con la proteína rep de *E. coli* (helicasa), participando en el desenrollamiento de la doble hélice. El grupo 3'OH que queda libre como consecuencia de la rotura es elongado por el holoenzima de la DNA polimerasa III y cuando el DNA sintetizado alcanza la longitud unidad, la proteína producto del gen A rompe de nuevo el origen estableciendo un nuevo enlace covalente con el nuevo extremo 5' y liberando DNA de longitud unidad cuyo grupo 3'OH es ligado al 5' fosfato por la misma proteína, regenerando el DNA circular de banda simple. Este puede ser utilizado para replicarse y sintetizar de nuevo la forma replicativa o, alternativamente, en presencia de las proteínas estructurales, puede encapsidarse para formar partículas virales.

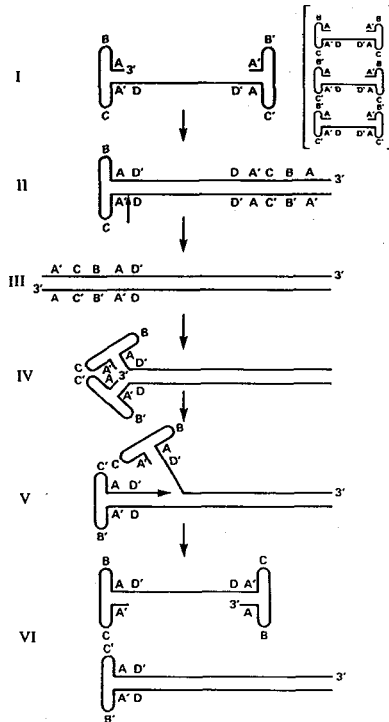


Figura 7. Modelo de replicación del virus asociado a adeno (Kornberg, 1982).

I. Las letras A, A', B, B', C, C' y D, D' indican las secuencias terminales repetidas. II. Una horquilla ha iniciado la síntesis de la banda complementaria para formar una forma replicativa. III. Rotura por una endonucleasa en el sitio indicado por la flecha en II y extensión de la cadena para dar lugar a desplazamiento de la horquilla. IV. Formación de la horquilla para crear un nuevo grupo 3'OH libre. V y VI. La extensión de la cadena produce el desplazamiento de una banda simple y una molécula de doble banda puede llevar a cabo otra ronda de transferencia de la horquilla.

Alternativamente al mecanismo de iniciación de la replicación mediante un RNA, existen DNAs lineales cuyos extremos 3' pueden formar estructuras en forma de horquilla que suministran el grupo 3'OH requerido por la DNA polimerasa. Un ejemplo de este mecanismo lo suministra el virus asociado a adeno, para el que se muestra el modelo propuesto de iniciación de la replicación en la Figura 7 (Kornberg, 1982).

Finalmente, existe un nuevo mecanismo de iniciación de la replicación en DNAs lineales que tienen una proteína unida covalentemente a sus extremos 5'. En estos casos, una molécula libre de la llamada proteína terminal actúa como iniciadora de la replicación y el grupo OH de un residuo de serina, treonina o tirosina de la misma es utilizado por la DNA polimerasa para unir covalentemente el primer nucleótido. El complejo de iniciación formado, proteína terminal-dNMP, suministra el grupo 3'OH necesario para que la DNA polimerasa continúe la polimerización de la cadena.

La Tabla II muestra un resumen de los cuatro mecanismos que se conocen en la actualidad para iniciar la replicación del DNA, con algunos ejemplos de sistemas que los utilizan.

Tabla II.

Mecanismos de iniciación de la replicación.

1. Síntesis de un RNA iniciador mediante una RNA polimerasa específica. Ejemplos: DNAs circulares, polímeros, replicación discontinua del DNA.
2. Producción de extremos 3'OH por rotura de una de las dos cadenas de un DNA circular en el origen de replicación. Ejemplos: Fago Φ X174, plásmidos de *Bacillus subtilis*.
3. Producción de una estructura en forma de horquilla ("Hairpin"). Ejemplos: Virus asociado a adeno, virus de la vacuna, virus de la peste porcina africana.
4. Proteína terminal iniciadora. Ejemplos: Fago Φ 29, adenovirus, poliovirus, virus de la fiebre aftosa.

3. BACTERIOFAGO Φ 29. ASPECTOS GENERALES

Uno de los sistemas mejor estudiados que inician la replicación mediante la proteína terminal es el bacteriófago Φ 29 de *B. subtilis*. El DNA de Φ 29 es lineal, de doble cadena y contiene 19.285 pb cuya secuencia completa se conoce en la actualidad (Yoshikawa e Ito, 1982; Garvey y cols. 1985; Víček y Pačes, 1986). Mediante el uso de mutantes sensibles a temperatura (ts) y sensibles a supresor (sus) de Φ 29 se han caracterizado un total de 18 genes que se han localizado en un mapa genético lineal (Mellado y cols. 1976). Como puede observarse en la Figura 8, existen genes tempranos localizados en los dos extremos del DNA, que se transcriben de derecha a izquierda, y genes tardíos, localizados en el centro del genoma, que se transcriben de izquierda a derecha. Los genes tardíos codifican a proteínas estructurales, morfogénicas y de lisis, mientras que los genes tempranos codifican a proteínas implicadas en la replicación del DNA viral (proteínas p1, p2, p3, p5, p6 y p17) y en el control de la transcripción tardía (proteína p4). Se ha purificado la proteína p4 a partir de células sobreproductoras de la misma y se ha desarrollado un sistema *in vitro* en el cual dicha proteína se requiere para la transcripción por el holoenzima de la RNA polimerasa de *B. subtilis*, a partir del promotor tardío de Φ 29 (Barthelemy y cols. 1987). La proteína p4 actúa como proteína activadora más que como subunidad tipo sigma y se une a secuencias específicas a la izquierda del promotor tardío de Φ 29.

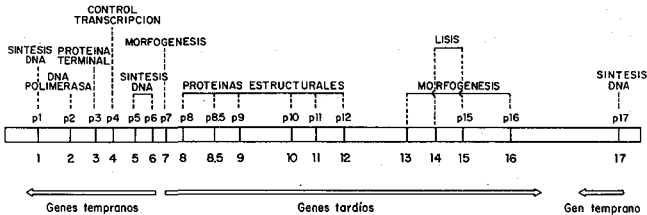


Figura 8. Mapa genético del DNA de Φ 29 (adaptado de Mellado y cols. 1976).

Las proteínas estructurales p8, p8.5 y p10 (que forman la cabeza del fago, las fibras y el conector, respectivamente), junto con la proteína morfogénica p7, forman la precabeza del fago (Méndez y cols. 1971; Hagen y cols. 1976; Camacho y cols. 1977; Jiménez y cols. 1977), donde posteriormente se empaqueta el DNA viral de un modo orientado empezando por la izquierda en un proceso que requiere la proteína morfogénica p16 y que no ocurre si se elimina la proteína terminal paterna unida al

DNA (Bjornsti y cols. 1981, 1982, 1983). Este proceso requiere ATP y se ha demostrado que la proteína p16 es una ATPasa dependiente de las precabezas y del complejo p3-DNA (Guo y cols. 1987b). Además, recientemente se ha encontrado que la encapsidación del DNA depende de la presencia de un RNA de unos 120 nucleótidos que se purifica asociado a las precabezas y que se sintetiza a partir del promotor temprano A1 localizado a la izquierda del DNA de $\Phi 29$ (Guo y cols. 1987a). Una vez empaquetado el DNA en las precabezas de $\Phi 29$, se une la proteína p11 que forma el collar inferior, lo que estabiliza al DNA dentro de la cabeza (Carmacho y cols. 1979); a continuación se ensambla la proteína p9, que forma la cola, en un proceso que depende de la proteína morfogenética p13 (García y cols. 1983a) y finalmente se ensambla la proteína p12 que forma los apéndices del cuello del fago, y que es la proteína implicada en la adsorción del fago a la bacteria (Villanueva y Salas, 1981). Una vez formadas las partículas virales, las bacterias son lisadas por la acción de las proteínas producto de los genes tardíos 15 y 16 (Carrascosa y cols. 1976; Saedi y cols. 1987). La Figura 9 muestra una fotografía al microscopio electrónico del fago $\Phi 29$ donde puede apreciarse su estructura de icosaedro alargado de 40 nm de longitud y 30 nm de anchura (Anderson y cols. 1966).

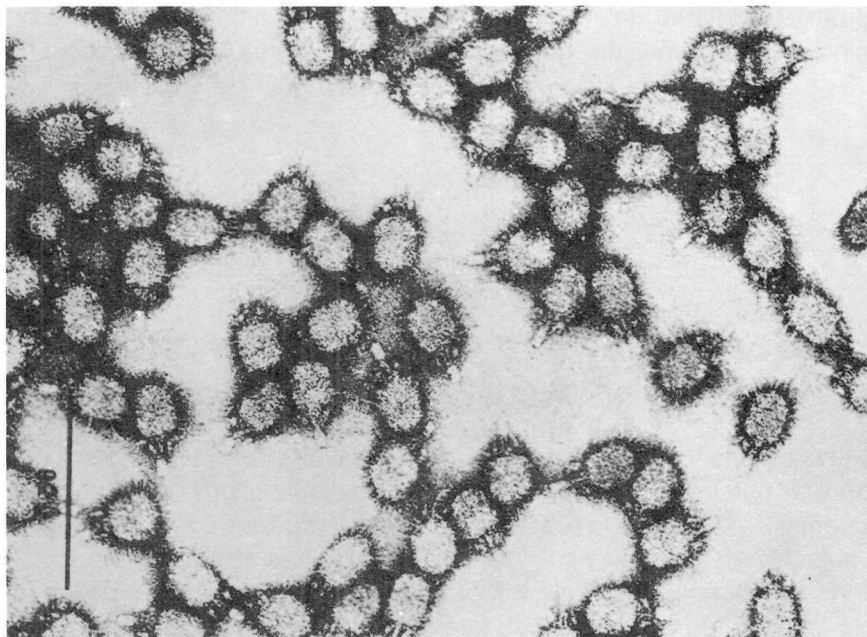


Figura 9. Micrografías electrónicas de $\Phi 29$ (Méndez y cols. 1971).

Debido a su pequeño tamaño, lo que implica una gran simplicidad genética, y su morfología relativamente compleja, $\Phi 29$ es un sistema modelo adecuado para estudios de morfogénesis de la partícula viral. Asimismo, $\Phi 29$ ha resultado ser un buen modelo para el estudio del control de la transcripción. Finalmente, el descubrimiento de la proteína terminal unida covalentemente a los extremos 5' del DNA de $\Phi 29$, que se describirá a continuación, ha hecho de $\Phi 29$ un sistema modelo para el estudio de un nuevo mecanismo de iniciación de la replicación mediante la proteína terminal que actúa como iniciadora del proceso.

4. CARACTERIZACION DE LA PROTEINA UNIDA COVALENTEMENTE A LOS EXTREMOS 5' DEL DNA DEL BACTERIOFAGO $\Phi 29$

4.1. Circularización del DNA de $\Phi 29$ por interacción proteína-proteína

La primera indicación sobre la existencia de una proteína unida a los extremos del DNA de $\Phi 29$ se obtuvo cuando se aislaron moléculas circulares o polímeros del DNA de $\Phi 29$ que, cuando se trataban con enzimas proteolíticas, se convertían en DNA lineal de longitud unidad (Ortín y cols. 1971). La Figura 10A muestra una molécula lineal del DNA de $\Phi 29$ en la que se puede ver una protuberancia en los dos extremos debido a la proteína terminal y la Figura 10B muestra una molécula circular, formada por interacción proteína-proteína, en la que también se puede observar la protuberancia debida a la proteína terminal. Posteriormente a este descubrimiento se encontró que el DNA de adenovirus daba lugar, de un modo similar, a moléculas circulares y polímeros que se convertían en DNA de longitud unidad por tratamiento con proteasas (Robinson y cols. 1973; Brown y cols. 1975).

4.2. Caracterización de la proteína terminal del DNA de $\Phi 29$

Posteriormente al descubrimiento de la circulación del DNA de $\Phi 29$, que sugería la existencia de proteína en los extremos del DNA, se de-

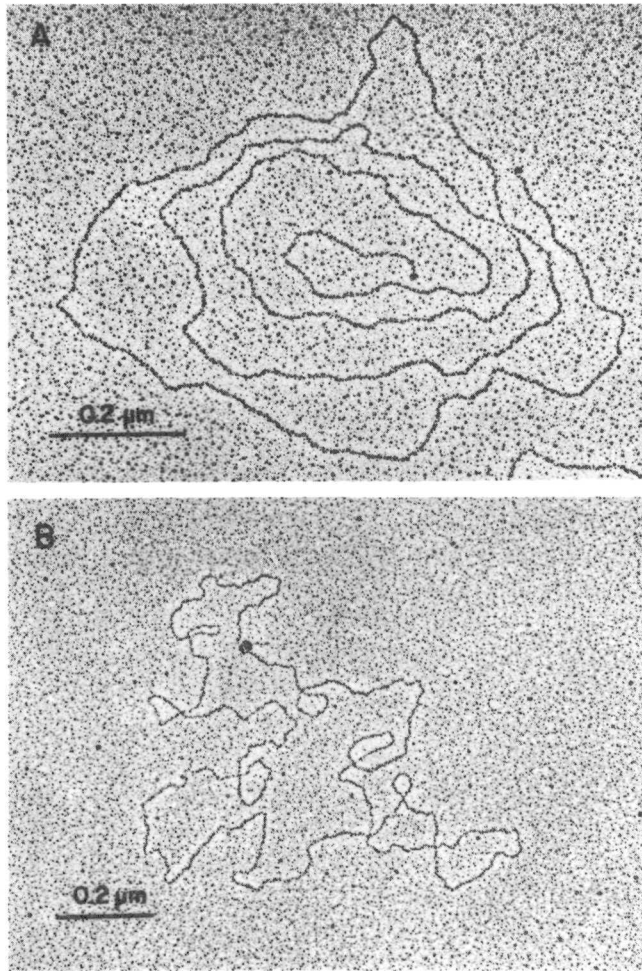


Figura 10. Micrografías electrónicas del complejo p3-DNA de $\Phi 29$.

A. p3-DNA de $\Phi 29$ lineal. B. p3-DNA de $\Phi 29$ circular. Se utilizó la técnica de extensión del bromuro de etidio, como se describe en Salas y cols. (1978). Las micrografías electrónicas fueron tomadas por J. M. Sogo.

mostró que la transfección de células de *Bacillus subtilis* por el DNA de $\Phi 29$ es sensible al tratamiento con proteasas (Hirokawa, 1972) y que el DNA aislado de un mutante de $\Phi 29$ sensible a temperatura en el gen 3 es termolábil en transfección (Yanofsky y cols., 1976). Efectivamente, se aisló un complejo DNA-proteína por diferentes métodos que incluían tratamientos que disocian proteínas unidas no covalentemente al DNA y se

demonstró que la proteína está unida muy fuertemente al DNA ya que no entra en un gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico a menos que se trate la muestra con una deoxiribonucleasa. Después de este tratamiento, la proteína que entra en el gel tiene la misma movilidad electroforética que la proteína p3 (Salas y cols. 1978; Harding y cols. 1978; Yehle, 1978) que es una proteína viral temprana esencial para la replicación del DNA de $\Phi 29$ (Carrascosa y cols. 1976; Hagen y cols. 1976; Yanofsky y cols. 1976). El análisis de los péptidos trípticos de ambas proteínas indicó que la proteína unida al DNA es p3 (Salas y cols. 1978). Se demostró que la proteína está unida a los extremos 5' del DNA puesto que éste no puede ser fosforilado por la polinucleótido quinasa y ATP- γ - ^{32}P , ni degradado por la exonucleasa del fago λ , que degrada al DNA desde los extremos 5' libres, pero puede ser degradado por la exonucleasa III, que degrada al DNA desde los extremos 3' (Salas y cols. 1978; Ito, 1978; Yehle, 1978).

Se han descrito otros fagos de *B. subtilis* similares morfológicamente a $\Phi 29$ y con un DNA lineal de doble cadena de tamaño similar, que se han clasificado en tres grupos serológicos. Uno de ellos incluye, junto con $\Phi 29$, los fagos $\Phi 15$, PZA y PZE; otro incluye los fagos Nf, M2Y y B103 y el tercer grupo está formado por el fago GA-1. La transfección por estos DNAs es sensible a tratamiento con enzimas proteolíticos, lo que sugiere la existencia de proteína terminal (Geiduschek e Ito, 1982; Fučík y cols. 1980). De hecho, se ha caracterizado una proteína terminal de tamaño similar a la de $\Phi 29$ en los fagos $\Phi 15$, PZA, Nf, M2Y, B103 y GA-1 (Yoshikawa e Ito, 1981; Pačes y cols. 1985; Gutiérrez y cols. 1986b). La comparación de los péptidos quimotrípticos y trípticos de las proteínas terminales de $\Phi 29$, $\Phi 15$, PZA, Nf, M2Y, B103 y GA-1 indicó que las proteínas terminales de $\Phi 29$, $\Phi 15$ y PZA son similares; las de Nf, M2Y y B103 están relacionadas entre sí y menos relacionadas a la de $\Phi 29$ que las de los fagos $\Phi 15$ y PZA; la proteína terminal de GA-1 no está relacionada a la de ninguno de los fagos anteriores (Gutiérrez y cols. 1986b). Estos resultados están de acuerdo con la clasificación en los tres grupos serológicos indicados antes y con el hecho de que suero anti-p3 reacciona de un modo similar en un radioinmunoensayo con las proteínas terminales de los fagos $\Phi 29$, $\Phi 15$ y PZA, mientras que no hay reacción significativa con las proteínas terminales de los fagos Nf, M2Y, B103 y GA-1 (Gutiérrez y cols. 1986b).

4.3 Naturaleza y sitio de enlace entre la proteína terminal p3 y el DNA de Φ 29

El enlace entre la proteína terminal p3 y el DNA de Φ 29 es una unión fosfodiéster entre el grupo OH de un residuo de serina en la proteína p3 y dAMP, que es el nucleótido terminal en los dos extremos 5' del DNA de Φ 29 (Hermoso y Salas, 1980). Posteriormente se determinó la secuencia de nucleótidos del gen 3, que codifica a una proteína de 266 aminoácidos que contiene 18 residuos de serina (Escarmís y Salas, 1982; Yoshikawa e Ito, 1982). Para determinar cuál de estos residuos de serina está implicado en el enlace, se aisló un péptido que permanece unido al DNA después del tratamiento con proteinasa K y se determinó su composición en aminoácidos, encontrándose un único residuo de serina. Los resultados obtenidos indicaron que el residuo de serina implicado en el enlace al DNA está localizado en la posición 232 de la proteína terminal (Hermoso y cols. 1985). La predicción de la estructura secundaria sugiere que dicho residuo de serina está localizado en un giro β , probablemente en la parte externa de la molécula, según se deduce de los valores de hidropatía (Hermoso y cols. 1985).

Actualmente se conoce también la secuencia de la proteína terminal del fago PZA, muy similar a la del fago Φ 29. Existen sólo seis cambios de aminoácidos y cinco de ellos son sustituciones neutras (Paces y cols. 1985). Por ello, se puede pensar que el residuo de serina en posición 232 de la proteína terminal del fago PZA está implicado en el enlace con el DNA.

Muy recientemente se ha determinado la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen E, que codifica a la proteína terminal del fago Nf, teniendo ésta un 66 % de homología con la de Φ 29 (Leavitt e Ito, 1987). Los perfiles de hidropatía y la estructura secundaria de la proteína terminal del fago Nf son muy similares a los de las proteínas terminales de los fagos Φ 29 y PZA, estando conservada la serina en posición 232, así como los dos aminoácidos anteriores y posteriores, por lo que se sugiere que dicho residuo de serina está implicado en la unión al DNA de Nf (Leavitt e Ito, 1987).

4.4. Otros ácidos nucleicos lineales con proteína terminal

Además de Φ 29 y fagos relacionados, se conocen otros dos fagos

con proteína terminal unida covalentemente a los extremos 5' del DNA: el fago Cp-1 y relacionados, que infectan a *Streptococcus pneumoniae*, cuya proteína terminal tiene un peso molecular de 28.000 daltons (García y cols. 1983b) y el fago PRD1 y relacionados, que infectan a bacterias gram-negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, cuya proteína terminal p8 tiene un peso molecular de 28.000 daltons y es el producto del gen VIII viral (Bamford y Mindich, 1984). La unión entre la proteína terminal y el DNA es un enlace fosfodiéster entre treonina y dAMP en el fago Cp-1 (García y cols. 1986a) y entre tirosina y dGMP en PRD1 (Bamford y Mindich, 1984). Recientemente se ha determinado la secuencia de la región del DNA que codifica a la proteína terminal del fago PRD1 y se ha confirmado que el peso molecular de la proteína es de 29.000 daltons con un total de 259 aminoácidos (Savilahti y Bamford, 1987; Hsieh y cols. 1987). Por otra parte, la comparación de la secuencia de aminoácidos entre la proteína terminal de los fagos PRD1, Φ 29 y Nf indica que no existe ninguna homología entre dichas proteínas (Hsieh y cols. 1987). Sin embargo, los perfiles de hidropatía de las tres proteínas son muy similares en la región carboxi-terminal. Sobre esta base, se ha sugerido que el enlace entre la proteína terminal del fago PRD1 y el DNA se realiza a través del residuo de tirosina en posición 226 (Hsieh y cols. 1987).

Como ya se ha indicado, el aislamiento de moléculas de DNA circulares y polímeros del DNA de adenovirus sugerían la existencia de proteína terminal unida a los extremos del DNA. Efectivamente, se caracterizó la proteína terminal de adenovirus, con un peso molecular de 55.000 daltons (Rekosh y cols. 1977) y se determinó que el enlace con el DNA se realiza mediante una unión fosfodiéster entre un residuo de serina específico y dCMP, el nucleótido 5' terminal en ambos extremos del DNA (Desiderio y Kelly, 1981). Como en el caso de Φ 29, dicho residuo de serina está localizado en un giro β , en la parte externa de la molécula, precedida de una hélice α . Por lo demás, no existe ninguna homología de secuencia entre ambas proteínas.

Otros DNAs lineales con proteína terminal son el plásmido pSLA2 de *Streptomyces* (Hirochika y Sakaguchi, 1982), los plásmidos "killer" pGKL1 y pGKL1 de *Kluyveromyces lactis* (Kikuchi y cols. 1984), cuya proteína terminal tiene un peso molecular de 28.000 y 36.000 daltons, respectivamente (Stam y cols. 1986), el plásmido pSKL de *Saccharomyces kluyveri* (Kitada e Hishinuma, 1987), el DNA mitocondrial S1 y S2 (Kemble

y Thompson, 1982) y de 2, 3 Kpb (Bedinger y cols. 1986) del maíz, un DNA mitocondrial de *Brasica* (Jurpen y cols. 1987), el plásmido pAI2 del hongo filamentoso *Ascobolus immersus* (Meinhardt y cols. 1986), el plásmido pFOXC2 del hongo patógeno de plantas *Fusarium oxysporum* (Kistler y Leong, 1986) y un plásmido de *Borrelia hermsii* que causa la fiebre recurrente (Plasterk y cols. 1985).

Un caso diferente en el que existe proteína terminal unida al extremo 5' de una de las dos cadenas de una molécula de DNA circular es el virus de la hepatitis B (Gerlich y Robinson, 1980).

Finalmente, existen proteínas terminales presentes en el extremo 5' del RNA de virus animales como el de la poliomielitis, fiebre aftosa, encefalomiocarditis, exantema vesicular y necrosis pancreática infecciosa y de virus de plantas como el del mosaico del chicharro (cowpea mosaic), mancha anillada del tabaco (tobacco ringspot), mosaico de la judía del sur (southern bean mosaic), grabado del tabaco (tobacco etch), enrollado de la patata (potato leafroll) y excrecencias del guisante (pea enation) (Daubert y Bruening, 1984). Recientemente, se ha detectado la presencia de proteína terminal en el extremo 5' del RNA del virus de la hepatitis A (Weitz y cols. 1986) y del enrollado del cerezo (cherry leafroll) (Hellen y Cooper, 198). El enlace entre la proteína terminal y el RNA es una unión fosfodiéster entre el nucleótido 5' terminal UMP y tirosina en el caso de poliovirus (Crawford y Baltimore, 1983), del virus de la fiebre aftosa (King y cols. 1980) y del virus de la encefalomiocarditis (Vartepetian y cols. 1984), mientras que es un enlace entre UMP y serina en el caso del virus del mosaico del chicharro (Jaegle y cols. 1987).

Las Tablas III y IV muestran un resumen de los virus y ácidos nucleicos lineales con proteína terminal que se han descrito hasta la fecha, así como sus características más relevantes.

Tabla III.

Proteínas unidas covalentemente a ácidos nucleicos de virus.

VIRUS	ACIDO NUCLEICO	ENLACE	PROTEINA	PM, KD
Φ29	DNA	SER-P	p3	31
Cp1	DNA	THR-P	TP	28
PRD1	DNA	TYR-P	p8	—
ADENO	DNA	SER-P	pTP	55(87)
HEPATITIS B	DNA	—	—	—
NECROSIS PANCREATICA	RNA	—	VPg	110
POLIO	RNA	TYR-P	VPg	2.3
HEPATITIS A	RNA	—	VPg	—
ENCEFALOMIOCARDITIS	RNA	TYR-P	VPgA;VPgB	10;8
FIEBRE AFTOSA	RNA	TYR-P?	VPgA;VPgB	~5
EXANTEMA VESICULAR	RNA	—	VPg	~10
MOSAICO DEL CHICHARRO	RNA	SER-P	VPg	~5
MOSAICO DE LAS EXCRECIAS DEL GUISANTE	RNA	—	VPg	~17.5
ENROLLADO DE LA PATATA	RNA	—	VPg	~7
GRABADO DEL TABACO	RNA	—	VPg	~6
MANCHA ANILLADA DEL TABACO	RNA	—	VPg	~4
MOSAICO DE LA JUDIA DEL SUR	RNA	—	VPg	~12
ENROLLADO DEL CEREZO	RNA	—	VPg	—

4.5. Secuencia de nucleótidos en los extremos del DNA de Φ29 y fagos relacionados.

Se conoce en la actualidad la secuencia de nucleótidos del DNA de Φ29, con 19.285 pb (Yoshikawa e Ito, 1982; Garvey y cols. 1985; Vlček y Pačes, 1986), y del fago relacionado PZA, con 19.366 pb (Pačes y cols. 1985, 1986a, 1986b). Todos los fagos de la familia de Φ29 tienen una repetición terminal invertida corta, de 6 pb (AAAGTA) en el DNA de Φ29,

Tabla IV.

Proteínas unidas covalentemente a los extremos de DNAs lineales de doble cadena.

DNA	Fuente
S1 y S2 mitocondrial	Maiz
Plásmido pSLA2	Streptomyces
Plásmidos pGKL1 y pGKL2	Kluyveromyces lactis
Plásmido pSKL	Saccharomyces kluyveri
Plásmido pAI2	Ascobolus immersus
Plásmido pFOXC2	Fusarium oxysporum
Plásmido fiebre recurrente	Borrelia hermsii

Φ 15, PZA y B103, de 8 pb (AAAGTAAG) en el DNA de Nf y M2Y y de 7 pb (AAATAGA) en el DNA de GA-1. Además, es idéntica la secuencia de los 18 pb del extremo izquierdo del DNA de Φ 29, Φ 15, PZA, Nf, M2Y y B103 y existen homologías entre los nucleótidos 19 al 50. El resto de la secuencia que se conoce del DNA de Φ 29, Φ 15 y PZA es similar entre sí y diferente de la de los DNAs de Nf, M2Y y B103, que comparten una secuencia similar. La secuencia en el extremo izquierdo del DNA de GA-1 no está relacionada con la de los otros DNAs, excepto en los 3 pb iniciales que son iguales. En el extremo derecho la secuencia de los 13 pb terminales es muy similar en los DNAs de Φ 29, Φ 15, PZA, Nf, M2Y y B103 y desde el nucleótido 27 al 38 existe una secuencia idéntica. El resto de la secuencia que se conoce es muy similar para los fagos Φ 29, Φ 15 y PZA entre sí, y para los fagos Nf, M2Y y B103 entre sí. La secuencia en el extremo derecho del DNA de GA-1 no está relacionada con la de los otros DNAs excepto en los 3 pb iniciales y la secuencia del nucleótido 29 al 40 que es casi idéntica a la presente del nucleótido 27 al 38 en los otros DNAs (Escarmís y Salas, 1981; Yoshikawa y cols. 1981, 1985; Pacés y cols. 1985, 1986b; Gutiérrez y cols. 1986b).

4.6. Secuencia de nucleótidos en los extremos de DNAs con proteína terminal

El DNA del fago Cp-1 tiene una repetición terminal invertida larga, de

236 pb, teniendo los 116 pb siguientes 93 % de homología en los dos extremos del DNA (Escarmís y cols. 1984). La repetición terminal invertida de los fagos relacionados Cp-5 y Cp-7 es de 343 y 347 pb, respectivamente (Escarmís y cols. 1985). La homología entre las repeticiones terminales invertidas de los tres DNAs es 84-92 %, siendo idénticos los 39 pb terminales en los tres DNAs. Por otra parte, el DNA de Cp-5 está más relacionado al de Cp-1 que el DNA de Cp-7, de acuerdo con la homología de las proteínas terminales.

Los fagos relacionados PRD1, PR4, PR5, PR722 y L17, aislados de diferentes partes del mundo, tienen repeticiones terminales invertidas de 109-110 pb. Los primeros 17 pb y los últimos 35 pb de la repetición terminal invertida están conservados en todos los virus. Entre estas secuencias conservadas hay una región variable de 58 pb que permite dividir a los fagos en dos grupos: 1) PRD1 y PR5 de Estados Unidos y Canadá y 2) PR4, PR722 y L17 de Australia, Suráfrica y el Reino Unido, respectivamente (Savilahti y Bamford, 1986).

En el caso de adenovirus, la repetición terminal invertida es de 103 a 162 pb, dependiendo del tipo de adenovirus (Tolun y cols. 1979).

Otros plásmidos lineales con proteína terminal tienen repeticiones terminales invertidas largas. Así, la de pSLA2 es de 614 pb (Hirochika y cols. 1984), la de pGKL1 y pGKL2 de 202 y 184 pb, respectivamente (Hishinuma y cols. 1984), la de pSKL de 483 pb (Kitada e Hishinuma, 1987), la del DNA mitocondrial S1 y S2 de maíz de 208 pb (Levings y Sederoff, 1983; paillard y cols. 1985) y la del DNA mitocondrial del maíz de 2.3 kpb, de al menos 50 pb, con 16 pb homólogos en los 17 pb de los extremos, a la secuencia del DNA de S1 y S2 (Bedinger y cols. 1986). El DNA mitocondrial de *Brassica* tiene una repetición terminal invertida de 325 pb (Turpen y cols. 1987) y el plásmido pAI2 de *Ascobolus immersus*, de aproximadamente 700 pb determinados por experimentos de desnaturalización y renaturalización (Meinhardt y cols. 1986).

Por tanto, la existencia de una repetición terminal invertida es una característica común de los DNAs lineales con proteína terminal, si bien su longitud varía considerablemente, desde 6 pb en el caso del DNA de Φ 29 hasta 614 pb en el plásmido pSLA2. Es también de destacar el hecho de que la secuencia terminal de Φ 29 (AAAGTA) es muy similar a la de Cp-1 (AAACTA), a la del DNA mitocondrial S1, S2 y 2, 3 kpb (AAAAG-

TA) y a la de los plásmidos pGKL2 de *Kluyveromyces lactis* (Hishinuma y cols. 1984) y pSKL de *Saccharomyces kluyveri* (Kitada e Hishinuma, 1987) (AAAAGGTA). El papel de esta secuencia en el reconocimiento de la proteína terminal para iniciar la replicación y el posible papel de la repetición terminal invertida en la replicación del DNA se discutirá más adelante.

5. REPLICACION IN VIVO DEL DNA DE $\Phi 29$

5.1. Intermedios replicativos del DNA de $\Phi 29$

El análisis al microscopio electrónico de los intermedios replicativos aislados de *B. subtilis* infectado con $\Phi 29$ indicó la existencia de dos clases mayoritarias de moléculas (Inciarte y cols. 1980; Harding e Ito, 1980), que se muestran en la Figura 11. Una es DNA de doble cadena de longitud unidad con colas de cadena simple en una posición al azar (tipo I), siendo la longitud de las colas de cadena simple igual a la de una de las

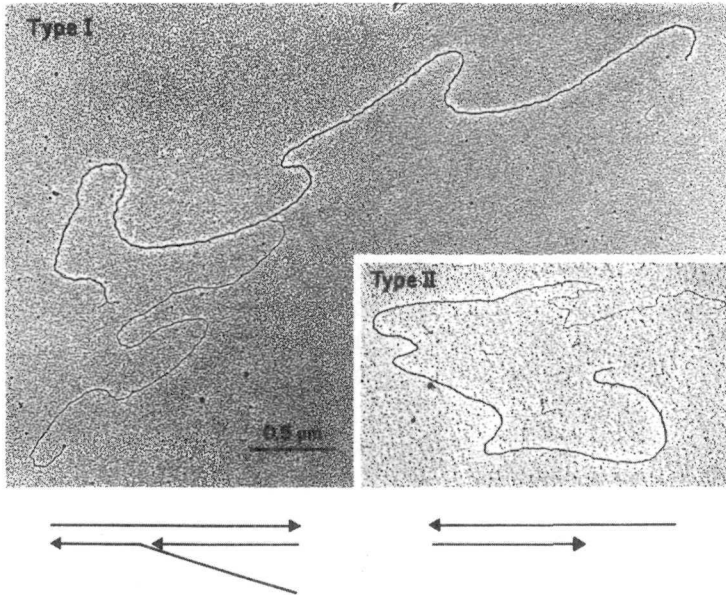


Figura 11. Micrografías electrónicas de intermedios replicativos tipo I y tipo II del DNA de $\Phi 29$.

Se utilizó la técnica de extensión del BAC como se describe en Sogo y cols. (1982). Las micrografías electrónicas fueron tomadas por J. M. Sogo.

regiones de cadena doble. El otro tipo de moléculas es DNA de longitud unidad con una región de cadena doble y otra de cadena simple en extensión variable desde el extremo (tipo II). La desnaturalización parcial de las moléculas de tipo II mostró que la replicación se inicia con una frecuencia similar desde cualquier extremo del DNA. Estos resultados indican que la replicación del DNA de $\Phi 29$ ocurre por un mecanismo de desplazamiento de banda y se inicia de un modo no simultáneo desde cualquier extremo del DNA. Además, se encontró proteína terminal en los extremos de las cadenas de DNA paternas e hijas (Sogo y cols. 1982) de acuerdo con una función de la proteína p3 en la iniciación de la replicación, como se verá más adelante.

5.2. Proteínas requeridas para la replicación *in vivo* del DNA de $\Phi 29$

Mediante el uso de los mutantes *sus* y *ts* de $\Phi 29$ se demostró que los genes 1, 2, 3, 5, 6 y 17 se requieren para la síntesis del DNA viral *in vivo* (Talavera y cols. 1972; Carrascosa y cols. 1976; Hagen y cols. 1976). Por otra parte, cuando se usaron los mutantes *ts* en los genes 2, 3, 5 y 6 se encontró que los genes 2 y 3 están implicados en un proceso de iniciación y los genes 5 y 6 en algún proceso de elongación en la replicación del DNA de $\Phi 29$ (Mellado y cols. 1980). Conviene indicar que en este tipo de experimentos no puede descartarse la posibilidad de que los genes 5 y 6 estén también implicados en iniciación. Mutantes *sus* en los genes 1 y 17, para los que no se tienen mutantes *ts*, dan lugar a una replicación retrasada (Carrascosa y cols. 1976).

En el caso del fago M2Y, los genes G, E y T están implicados en la síntesis del DNA viral *in vivo*; los genes G y E corresponden a los genes 2 y 3 de $\Phi 29$, respectivamente (Matsumoto y cols. 1983).

Respecto a los genes bacterianos necesarios para la replicación del DNA de $\Phi 29$, las DNAs polimerasas I y III no se requieren puesto que la replicación del fago tiene lugar en mutantes *polA*⁻ (Peñalva y Salas, 1982) así como en presencia de 6(p-hidroxifenilazo)-uracilo (Talavera y cols. 1972), un inhibidor de la DNA polimerasa III de *B. subtilis* (MacKenzie y cols. 1973). Por otra parte, $\Phi 29$ se desarrolla normalmente a 48°C en los mutantes de replicación de *B. subtilis* (Henney y Hoch, 1980) *ts dna B19*, *ts dna C30*, *ts dna D23*, *ts dna E20*, *ts dna F133*, *ts dna I102* y QB1506 (*dna-8132*), siendo reducido el rendimiento en fago unas diez

veces en los mutantes *ts dna G34* y *ts dna H151* y no habiendo desarrollado en el mutante *ts dna A13* (Salas, 1987). Por consiguiente, el gen *dnaA*, implicado en la reducción de ribonucleótidos, parece ser necesario para la replicación de $\Phi 29$, los genes *dna G* y *dna H* son parcialmente dispensables y el resto de los genes bacterianos ensayados no parecen requerirse en la replicación del DNA de $\Phi 29$.

La replicación *in vivo* del DNA de $\Phi 29$ y M2Y es inhibida por afidicolina (Hirokawa y cols. 1982), un inhibidor típico de la DNA polimerasa α eucariótica (Huberman, 1981). Como se verá más tarde, esta droga inhibe a la DNA polimerasa inducida por $\Phi 29$.

5.2 Replicación *in vivo* de otros DNAs con proteína terminal

La replicación del DNA de Cp-1 también empieza en los extremos del DNA. Como en el caso de $\Phi 29$, la replicación de Cp-1 no es inhibida por 6(p-hidroxifenilazo)-uracilo y es inhibida por afidicolina (García y cols. 1986b), lo que sugiere un mecanismo de replicación muy similar al del fago $\Phi 29$.

En el caso del fago PRD1, no hay replicación *in vivo* en bacterias infectadas en condiciones restrictivas por mutantes *sus* de la clase I y VIII, lo que implica el requerimiento de las proteínas p1 y p8. Cuando las bacterias se infectan con mutantes *sus* de la clase XII, a los que le falta la proteína p12, la replicación disminuye (Mindich y cols. 1982). Por otra parte, las proteínas del huésped rep y las topoisomerasas I y II no se requieren para la replicación del DNA de PRD1 (Davis y Cronan, 1983; Bamford y Mindich, 1984).

La replicación del DNA de adenovirus *in vivo* ocurre de un modo muy similar al descrito para el DNA de $\Phi 29$. Así, se encontraron los dos tipos de moléculas I y II, que se describieron por primera vez en este sistema (Lechner y Kelly, 1977), encontrándose también proteína terminal en las cadenas de DNA paternas e hijas (Kelly y Lechner, 1979). La replicación de adenovirus *in vivo* es también inhibida por afidicolina (Pincus y cols. 1981).

6. REPLICACION IN VITRO DEL DNA DE Φ 29. REACCION DE INICIACION

6.1. Formación de un complejo covalente entre la proteína terminal de Φ 29 y 5'-dAMP

El modelo de iniciación de la replicación en que la proteína terminal actúa como iniciadora (primer), propuesto inicialmente por Rekosh y cols. (1977) para la replicación del DNA de adenovirus, postula que una molécula de proteína terminal libre se localiza en los extremos del DNA por interacción proteína-proteína y proteína-DNA y reacciona con el dNTP correspondiente al nucleótido 5' terminal para formar un complejo covalente proteína terminal-dNMP que suministra el grupo 3'OH libre necesario para la elongación por la DNA polimerasa.

Cuando se incuban extractos de *B. subtilis* infectado con Φ 29 con dATP- α -P³² en presencia de DNA Φ 29-proteína p3 (p3-DNA) como molde se encuentra una proteína marcada radiactivamente, con la movilidad electroforética de la proteína p3, que no se forma en presencia de suero anti-p3 o cuando se usan extractos de *B. subtilis* sin infectar (Peñalva y Salas, 1982; Shih y cols. 1982, 1984; Watabe y cols. 1982; Matsumoto y cols. 1983). Cuando la proteína marcada con P³² se incuba con piperidina, en condiciones en que se hidroliza el enlace entre el DNA y la proteína p3, se libera 5'dAMP, indicando la formación de un complejo covalente p3-dAMP. Este complejo puede ser elongado *in vitro*, indicando que se trata de un complejo de iniciación (Peñalva y Salas, 1982). Cuando se usan extractos de *B. subtilis* infectado con el fago M2Y, se forma también un complejo de iniciación entre la proteína terminal del fago y 5'dAMP (Matsumoto y cols. 1983).

6.2. Requerimientos proteicos para la formación del complejo de iniciación de Φ 29

De acuerdo con el modelo propuesto, cuando se usan extractos de *B. subtilis* *su*⁻ infectado con un mutante *sus* en el gen 3 en el sistema descrito antes, no se forma complejo de iniciación p3-dAMP, puesto que dichos extractos no suministran proteína p3 libre. Células infectadas con un mutante *sus* en el gen 2 tampoco dan lugar a la formación del complejo de iniciación, pero la actividad se restablece cuando se complementan ambos extractos, *sus*2 y *sus*3, lo que indica que para la reacción de

iniciación se requieren los productos de los genes 2 y 3 (Blanco y cols. 1983; Matsumoto y cols. 1983). Cuando se usan en la reacción de iniciación extractos de *B. subtilis* *su*⁻ infectado con mutantes *sus* en los genes 6 y 17, o *B. subtilis* infectado a temperatura restrictiva con un mutante *ts* en el gen 5, se forma complejo de iniciación p3-dAMP, lo que indica que los productos de los genes 5, 6 y 17 no son esenciales para la reacción de iniciación *in vitro* (Blanco y cols. 1983; Matsumoto y cols. 1983). Estos resultados son consistentes con el papel *in vivo* de los productos de los genes 2 y 3 en iniciación y de los genes 5 y 6 en elongación (Mellado y cols. 1980).

De un modo similar, extractos de *B. subtilis* *su*⁻ infectado con mutantes de M2Y *sus* G y *sus* E (que corresponden a los genes 2 y 3 de Φ 29, respectivamente) son inactivos en la formación del complejo de iniciación (Matsumoto y cols. 1983).

6.3. Formación del complejo de iniciación en otros sistemas que tienen DNA lineal con proteína terminal

La incubación de extractos de *S. pneumoniae* infectado con el fago Cp-1 con dATP- α -P³² da lugar a la formación de una proteína marcada con P³² con la movilidad electroforética de la proteína terminal de Cp-1. La proteína no se marca cuando se usan extractos de bacterias no infectadas. Cuando la proteína marcada se incuba con piperidina se libera 5'dAMP, lo que indica la formación de un complejo covalente entre la proteína terminal y 5'dAMP. La adición de los cuatro dNTPs a la mezcla de incubación da lugar a la formación de un complejo marcado de menor movilidad electroforética en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, lo que indica que el complejo proteína terminal-dAMP puede ser elongado y es, por tanto, un complejo de iniciación (García y cols. 1986).

Cuando se incuban extractos de *S. typhimurium* infectado con el fago PRD1 con dGTP- α -P³² se marca con P³² una proteína con la movilidad electroforética de la proteína terminal p8 (Bamford y cols. 1983). Dicha proteína no se marca cuando se usan extractos de bacterias sin infectar. Cuando se usan extractos de bacterias *su*⁻ infectadas con mutantes *sus* en los genes I y VIII, no se forma complejo p8-dGMP, aunque ambos extractos complementan, lo que indica que se requieren los productos de los genes I y VIII para la reacción de iniciación (Bamford y Mindich, 1984).

Por otra parte, se ensayó la implicación de funciones de replicación del huésped en la formación del complejo p8—dGMP usando extractos de *E. coli* ts para los genes de replicación dna B, dna E, dna A, dna G, dna Z y dna P, cada uno de los cuales conteniendo los genes virales esenciales que codifican a las proteínas p1 y p8. Todos los mutantes, excepto el dna G, son sensibles a temperatura en la formación del complejo de iniciación, lo que sugiere que la mayor parte del complejo de replicación del huésped se requiere para la iniciación (Bamford y Mindich, 1984).

También en el caso de adenovirus se puso a punto un sistema *in vitro* de células infectadas que, en presencia de dCTP— α —P³² y complejo proteína terminal—DNA como molde, da lugar a la formación de un complejo de iniciación entre una proteína de peso molecular 80.000 daltons y dCMP, el nucleótido 5' terminal. La proteína de 80.000 daltons es un precursor de la proteína terminal de 55.000 daltons (Lichy y cols. 1981; Pincus y cols. 1981; Challberg y cols. 1982; Tamanoi y Stillman, 1982; de Jong y cols. 1982).

En el resto de los sistemas que tienen DNA lineal con proteína terminal, aún no se ha estudiado la posible formación de un complejo de iniciación.

En los sistemas que tienen RNA con proteína terminal, se ha detectado un posible complejo de iniciación en el caso del virus de la poliomielitis (Morrow y cols. 1984) y de la encefalomiocarditis (Vartapetian y cols. 1984).

6.4. Sobreproducción y purificación de las proteínas p2 y p3 de Φ 29. Actividad en la formación del complejo de iniciación

Puesto que la cantidad de proteínas p2 y p3 que se sintetiza en *B. subtilis* infectado con Φ 29 es relativamente baja, se clonaron los genes 2 y 3 en plásmidos de *E. coli* bajo el control del promotor P_L del fago λ (García y cols. 1983c; Blanco y cols. 1984). Cuando se inducen a 42°C las células de *E. coli* que contienen cada uno de los plásmidos recombinantes y que además contienen el represor de λ sensible a temperatura, se detecta la síntesis de proteína p2 y p3, respectivamente. Tanto la proteína p2 como la p3 sintetizada en *E. coli* son activas en la formación del complejo de iniciación cuando se complementan con extractos de *B. subtilis* infectado con un mutante *sus3* o *sus2*, respectivamente. Ambas proteínas se

obtuvieron altamente purificadas en forma activa (Blanco y Salas, 1984; Prieto y cols. 1984).

Cuando las proteínas p2 y p3 purificadas se ensayan *in vitro* en la formación del complejo de iniciación en presencia de dATP- α -P³² y p3-DNA como molde, se observa la formación de una pequeña cantidad de p3-dAMP, que se estimula fuertemente por adición de SO₄(NH₄)₂ 10–20 mM (Blanco y Salas, 1985b). La estimulación por SO₄(NH₄)₂ se debe probablemente a la formación de un complejo entre las proteínas p2 y p3, que se detecta por centrifugación en gradiente de glicerol en presencia, pero no en ausencia, de SO₄(NH₄)₂ (Blanco y cols. 1987).

6.5. Actividades DNA polimerasa y 3'→5' exonucleasa de la proteína p2

La proteína p2, además de catalizar la reacción de iniciación, tiene actividad DNA polimerasa cuando se ensaya con un molde con iniciador como poli dA-(dT)_{12–18} o con DNA activado (Blanco y Salas, 1984; Watabe y cols. 1984). Por análisis en gel de poliacrilamida *in situ*, la actividad DNA polimerasa se encuentra en la banda de proteína p2 (Blanco y Salas, 1984).

Además, la DNA polimerasa de Φ 29 tiene actividad 3'→5' exonucleasa sobre DNA de banda simple, pero no tiene actividad 5'→3' nucleasa (Blanco y Salas, 1985a). La actividad 3'→5' exonucleasa, que podría suministrar un mecanismo de corrección de pruebas, parece estar asociada con la DNA polimerasa, puesto que las dos actividades se inactivan con el calor con una cinética similar y cosedimentan en un gradiente de glicerol (Blanco y Salas, 1985a). Además, la actividad de iniciación de la proteína p2 cosedimenta con las actividades DNA polimerasa y 3'→5' exonucleasa, indicando que las tres actividades están presentes en la misma proteína.

7. REPLICACION IN VITRO DEL DNA DE Φ 29. REACCION DE ELONGACION

7.1. Elongación del complejo de iniciación p3-dAMP con proteínas p2 y p3 purificadas. Procesividad de la DNA polimerasa de Φ 29

Cuando se usan en el sistema *in vitro* las proteínas p2 y p3 purificadas, el complejo p3-DNA como molde y los 4 dNTPs, el complejo de iniciación p3-dAMP es elongado produciendo DNA de longitud unidad (Blanco y Salas, 1985b). La presencia del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ produce un aumento de 3 veces en la velocidad de replicación, alcanzándose una velocidad de 80 nucleótidos/segundo (Blanco y cols. 1987).

Para determinar la procesividad de la DNA polimerasa, es decir, si la molécula de enzima que inicia una cadena de DNA continúa la polimerización hasta el final sin soltarse del complejo de replicación, se diluye la DNA polimerasa hasta más de 100 veces y se analiza el DNA sintetizado por electroforesis en geles alcalinos de agarosa. En todos los casos se obtiene DNA de longitud unidad, lo que indica que la DNA polimerasa que inicia la replicación prosigue la polimerización sin disociarse (Blanco y cols. 1988). Además, el resultado anterior sugiere que la DNA polimerasa de $\Phi 29$ tiene actividad tipo helicasa puesto que parece ser capaz de producir desplazamiento de banda. Sin embargo, teniendo en cuenta la presencia de la proteína terminal en el sistema, ésta podría tener la actividad helicasa y conferir la procesividad a la DNA polimerasa.

Por tanto, se estudió la replicación del DNA de M13 con un oligonucleótido como iniciador en presencia de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ como única proteína en el sistema. Se observa que la DNA polimerasa de $\Phi 29$ es capaz de replicar el DNA de M13 en 5 min a 30°C sin ninguna parada significativa. A tiempos de incubación más largos (40 min) se obtiene una longitud superior a las 70 Kb, más de 10 veces la longitud del DNA de M13 (Blanco y cols. 1988). Estos resultados indican que la DNA polimerasa de $\Phi 29$ es muy procesiva y puede producir desplazamiento de banda.

7.2. Replicación *in vitro* del DNA adenovirus

El precursor de la proteína terminal y la DNA polimerasa de adenovirus se han purificado también en forma de un complejo bastante estable (Enomoto y cols. 1981), aunque éste se puede disociar demostrándose que las dos proteínas son esenciales para la reacción de iniciación (Lichy y cols. 1982; Stillman y cols. 1982). Además, se ha purificado un factor nuclear (NFI) de células no infectadas (Nagata y cols. 1982) que también se requiere para la reacción de iniciación. Para la elongación del complejo preproteína terminal-dCMP, se requiere otra proteína viral, la proteína

que se une a DNA (DBP) (Ikeda y cols. 1981). Además, a diferencia del sistema de $\Phi 29$, para obtener DNA de longitud unidad, se requiere otro factor nuclear (NFII) que se ha caracterizado como una topoisomerasa I (Nagata y cols. 1983). Más recientemente se ha descrito otro factor nuclear (NFIII) que estimula la reacción de iniciación (Pruijn y cols. 1986). Los factores nucleares NFI y NFIII son proteínas que se unen a DNA de doble cadena, a secuencias específicas próximas a los extremos del DNA de adenovirus. El NFI reconoce la secuencia que va desde el nucleótido 25 al 38 (De Vries y cols. 1987) y el NFIII la que va del nucleótido 39 al 50 (Pruijn y cols. 1986). Es interesante resaltar el hecho de que el NFI es el factor de transcripción que se une a la secuencia CCAAT que estimula la iniciación de la transcripción *in vitro* desde el promotor de la α -globina humana que contiene dicha secuencia (Jones y cols. 1987). Por otra parte, el NFIII reconoce la secuencia ATGCAAAT en el DNA de adenovirus, que está también presente en elementos promotores y activadores de transcripción en eucarióticos (Pruijn y cols. 1987).

7.3. Efecto de afidicolina, ácido fosfonoacético y análogos de nucleótidos sobre la DNA polimerasa de $\Phi 29$

La replicación del complejo p3-DNA es inhibida por las drogas afidicolina, ácido fosfonoacético y los análogos de nucleótidos butilanolilino dATP (BuAdATP) y butilfenil dGTP (BuPdGTP), conocidos inhibidores de la DNA polimerasa α eucariótica (Huberman, 1981; Khan y cols. 1984, 1985) y de otras DNA polimerasas virales tipo α (Knopf, 1979; Nishiyama y cols. 1983; Moss y Cooper, 1982; Sridha y Condit, 1983; Kallin y cols. 1985). Mientras que los análogos de nucleótidos BuAdATP y BuPdGTP inhiben los procesos de iniciación y elongación de la replicación del complejo p3-DNA, las drogas afidicolina y ácido fosfonoacético inhiben la elongación, pero no afectan el paso de iniciación de la replicación del p3-DNA (Blanco y Salas, 1986; Bernad y cols. 1987). Además, tanto la afidicolina como los análogos de nucleótidos inhiben la polimerización por la proteína p2 usando DNA activado, así como la actividad 3'→5' exonucleasa, indicando que el blanco de las drogas es la propia DNA polimerasa (Blanco y Salas, 1986). Esto está de acuerdo con la obtención de mutantes de $\Phi 29$ resistentes a afidicolina que están localizados en el gen 2, que codifica a la DNA polimerasa (Matsumoto y cols. 1986). Todos estos resultados sugieren la existencia de dos dominios en la DNA polimerasa de $\Phi 29$, uno para la iniciación en el cual el dAMP se une covalentemente

al grupo OH del residuo de serina 232 en la proteína terminal, y otro para la elongación, en el cual un dNMP se une covalentemente al grupo 3'OH de otro dNMP incorporado en la cadena del DNA. La existencia de dos sitios en la proteína p2 está de acuerdo con el hecho de que se requiere una concentración diferente de dATP para la iniciación y para la elongación. Mientras que la iniciación puede tener lugar a concentración muy baja de dATP (0.1 μM), la elongación requiere una concentración de dATP mayor ($>1 \mu\text{M}$) (Blanco y cols. 1986).

7.4. Homologías de aminoácidos entre la DNA polimerasa de $\Phi 29$ y otras DNA polimerasas

Se ha descrito recientemente la existencia de tres dominios de aminoácidos conservados en la región carboxiterminal de varias DNA polimerasas virales tipo α y en la DNA polimerasa de $\Phi 29$, con la secuencia SLYP, NS-YG-F y Y-DTDS para el segmento I, II y III, respectivamente. Uno de estos dominios se ha propuesto que es el sitio de unión del ácido fosfonoacético (Larder y cols. 1987; Knopf, 1987). Estas regiones homólogas están presentes también en la DNA polimerasa del fago PRD1 (Savilahti y Bamford, 1987) y en la DNA polimerasa del fago T4, de acuerdo con la inhibición de ésta por afidicolina y análogos de nucleótidos (Bernad y cols. 1987). Además, hemos encontrado que el plásmido lineal pGKL1 (Kikuchi y cols. 1984) y el DNA mitocondrial lineal S1 (Kemble y Thompson, 1982) que, como se indicó anteriormente, tienen proteína terminal en sus extremos 5', también contienen las tres regiones de aminoácidos conservados (Bernad y cols. 1987), lo que sugiere que estos dos DNAs lineales codifican a su propia DNA polimerasa, de acuerdo con el papel de ésta en la iniciación de la replicación.

La Figura 12 muestra las regiones consenso derivadas del estudio de la secuencia de aminoácidos de las distintas DNA polimerasas. Es posible distinguir secuencias consenso específicas para las diferentes estrategias de replicación, como por ejemplo el consenso 1 para las DNA polimerasas de genomas que contienen proteína terminal y el consenso 3 para el resto de las DNA polimerasas. Además, es interesante señalar el hecho de que, en el segmento II, existe una inserción de unos 25 aminoácidos en el caso de las DNA polimerasas correspondientes a genomas con proteína terminal. Puesto que el resto de las DNA polimerasas carecen de dicha inserción, se puede especular que esta región está implicada en la reacción de iniciación de la replicación, quizás en el reconoci-

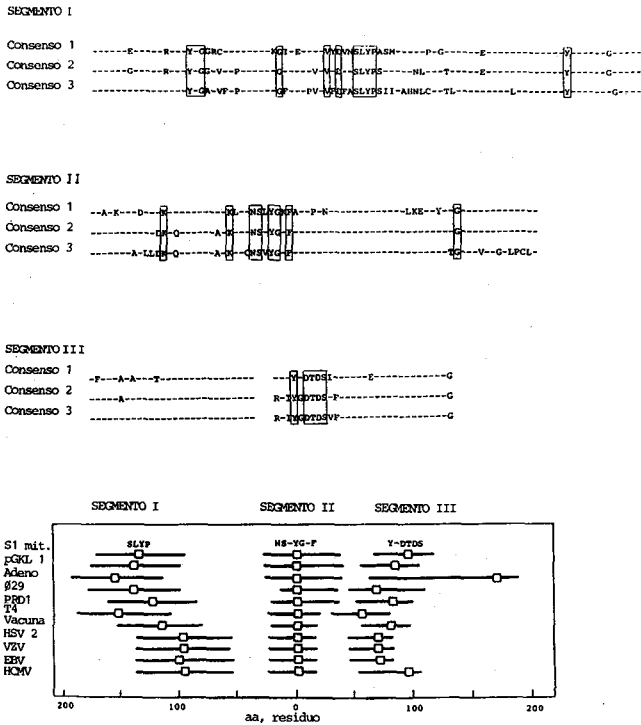


Figura 12. Segmentos de homología en la región carboxi terminal entre varias DNA polimerasas de origen procariótico y eucariótico.

Se compararon las siguientes secuencias de DNA polimerasas: DNA mitocondrial S1 (Paillard y cols. 1985), pGKL1 (Stark y cols. 1984), adenovirus tipo 2 (Aleström y cols. 1982), fago Φ 29 (Yoshikawa e Ito, 1982), fago PRD1 (Savilahti y Bamford, 1987), fago T4 (Spicer, E.K., resultados no publicados; GeneBank, 1986), virus de la vacuna (Earl y cols. 1986), virus Herpes simplex 2 (HSV2) (Tsurumi y cols. 1987), virus Varicela Zoster (VZV) (Davison y Scott, 1986), virus Epstein-Barr (EBV) (Baer y cols. 1984) y Citomegalovirus humano (HCMV) (Kouzarides y cols. 1987). Un residuo se consideró consenso si estaba presente en más de la mitad de los polipéptidos considerados. El consenso 1 indica los residuos consenso entre DNA polimerasas de genomas que contienen proteína terminal (S1 mit., pGKL1, adeno, Φ 29 y PRD1). El consenso 2 indica los residuos consenso entre todas las DNA polimerasas. El consenso 3 indica los residuos consenso entre las DNA polimerasas de genomas que no tienen proteína terminal (T4, vacuna, HSV2, VZV, EBV y HCMV). El hueco en el segmento III corresponde a inserciones de 78 y 113 aminoácidos en la DNA polimerasa de adenovirus y HCMV, respectivamente. Se han encuadrado los aminoácidos que son idénticos en las tres clases de consenso consideradas. La relación lineal entre los segmentos I-III (barras negras) de cada polimerasa se muestran en la parte de abajo de la Figura. El residuo de tirosina en el motivo consenso NF-YG-F del fragmento II se tomó como residuo O en cada caso. Los cuadrados indican el motivo consenso principal en cada segmento.

miento de la proteína terminal por la DNA polimerasa para la unión del primer nucleótido. Si esto fuese correcto, otras DNA polimerasas cuya secuencia se determine deben contener dicha inserción si corresponden a genomas con proteína terminal y deben carecer de ella en el resto de los casos. La Figura 12 también muestra que los tres segmentos de homología de aminoácidos están localizados colinealmente en las distintas DNA polimerasas.

También se ha encontrado una región de homología hacia el extremo amino terminal de varias DNA polimerasas, de las que se pueden derivar las secuencias consenso que se muestran en la Figura 13. En esta región también se ha encontrado homología en la DNA polimerasa del fago T7, además de las otras polimerasas indicadas antes. En el caso de la DNA polimerasa del fago T4, la actividad 3'→5' exonucleasa correctora de pruebas se ha localizado en esta región y también se han localizado en sitios próximos una serie de mutantes de la DNA polimerasa de T4 que afectan la fidelidad de la replicación (Reha-Krantz, 1988).

CONSENSO 1	-Y-HN-----FD-----
CONSENSO 2	VTG-N--N-FD--I--L---
CONSENSO 3	VTGYNI-N-FD-PYI--RL---I

Figura 13. Segmentos de homología en la región amino terminal entre varias DNA polimerasas de origen procariótico y eucariótico.

Las secuencias consenso 1, 2 y 3 indican lo mismo que en la Figura 12, excepto que en la consenso 1 se han incluido S1, adeno, Φ 29 y PRD1 y en la secuencia 3, T4, T7 (Ollis y cols. 1985), vacuna, HSV2, VZV, EBV y HCMV. El primer aminoácido incluido corresponde a las posiciones 294, 272, 58, 67, 210, 57, 235, 463, 443, 375 y 404 para las DNA polimerasas de S1, adeno, Φ 29, pRD1, T4, T7, vacuna, HSV2, VZV, EBV y HCMV, respectivamente.

7.5. Relaciones evolutivas entre DNA polimerasas

Las homología en el segmento I se han considerado como un índice de la relación evolutiva entre las DNA polimerasas puesto que es el segmento que tiene una longitud similar en las distintas polimerasas. La Tabla V muestra el porcentaje de residuos idénticos en el segmento I entre cada par de DNA polimerasas. Puede verse que las polimerasas del grupo del virus Herpes están muy próximos. Sorprendentemente, la DNA polimerasa de T4 está más relacionada a las DNA polimerasas eucarióticas que a las procarióticas, en especial a la DNA polimerasa del virus de la vacuna. De hecho, la comparación detallada del segmento I de la DNA polimerasa del fago T4 y del virus de la vacuna sugiere que derivaron de un antecesor común (Bernad y cols. 1987).

Tabla V.
Homología de aminoácidos entre DNA polimerasas procarionóticas y eucarióticas.

	SI mit.	pGKL 1	Adeno	Ø29	PRD1	T4	Vacuna	HSV 2	VZV	EBV	HCMV
SI mit.	100	25.6	17.9	25.6	20.5	14.1	16.7	20.5	16.7	15.4	14.1
pGKL 1	26.2	100	22.5	21.2	26.2	12.5	16.2	15.0	16.2	18.7	17.5
Adeno	17.1	21.9	100	23.2	18.3	8.5	7.3	17.1	17.1	13.4	17.1
Ø29	24.1	20.5	22.9	100	27.7	15.7	18.1	20.5	19.3	18.1	20.5
PRD1	22.5	26.2	20.0	28.7	100	15.0	15.0	23.7	20.0	18.7	15.0
T4	11.9	11.9	8.3	15.5	14.3	100	32.1	17.9	20.2	19.0	22.6
Vacuna	15.1	15.1	7.0	17.4	13.9	31.4	100	26.7	20.9	23.3	19.8
HSV 2	19.0	14.3	17.9	20.2	23.8	19.0	28.6	100	59.5	46.4	42.3
VZV	15.7	16.9	18.1	19.3	19.3	21.7	21.7	60.2	100	48.2	44.6
EBV	13.8	14.9	12.6	17.2	14.9	19.5	23.0	44.8	44.8	100	46.0
HCMV	13.2	16.9	16.9	21.7	15.7	22.9	20.5	43.4	44.6	48.2	100

Los números indican el % de homología de aminoácidos en el segmento I (Fig. 12) entre cada par de DNA polimerasas. Se indican también los valores recíprocos debido a la distinta longitud de la secuencia considerada 100 % en cada comparación. Las cajas indican el valor máximo obtenido para cada DNA polimerasa (Bernad y cols. 1987).

Las DNA polimerasas que se predicen para el plásmido lineal pGKL1 y el DNA mitocondrial S1 tienen máxima homología entre sí, y con las DNA polimerasas de los fagos $\Phi 29$ y PRD1, de acuerdo con un posible mecanismo de replicación que se inicia por proteína. Estos resultados sugieren una relación filogenética entre virus y plásmidos.

7.6. Relaciones estructura-función entre las DNA polimerasas

La conservación de los diferentes dominios entre las DNA polimerasas que se muestra en las Figuras 12 y 13 y en la Tabla V sugiere que estas regiones corresponden a dominios funcionales del enzima. Por ello, la mutagénesis dirigida de los dominios conservados puede ayudar a correlacionar la estructura y función de las DNA polimerasas. Así, se han obtenido mutantes en el segmento III de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ en los que se han realizado los cambios que se muestran en la Figura 14, tratando de que el cambio no altere la estructura secundaria de la proteína resultante. Cada uno de estos mutantes se pasará a un vector de expresión bajo el control del promotor $\Phi 10$ de la RNA polimerasa del fago T7 para sobreproducir la proteína mutada correspondiente y estudiar qué actividad de la DNA polimerasa está afectada por la mutación. Similarmente, se realizarán cambios puntuales en cada uno de los otros segmentos. Por otra parte, se dispone de mutantes *ts* en el gen 2 que se han

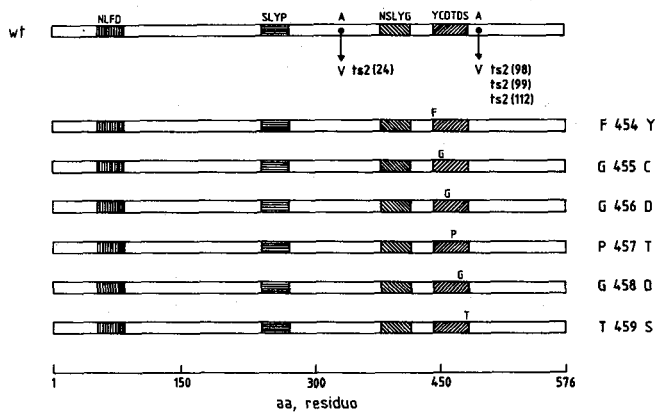


Figura 14. Mutagénesis dirigida de la DNA polimerasa de $\Phi 29$.

Se muestran los distintos mutantes obtenidos en el segmento III. Además, se indican las posiciones de las mutaciones puntuales en los mutantes de $\Phi 29$ *ts2*(24), *ts2*(98), *ts2*(99) y *ts2*(112), determinadas por secuenciación del DNA (Bernad, A., Parés, E. y Salas, M., resultados no publicados).

secuenciado. El mutante *ts2(24)* tiene un cambio de una valina en la posición 355 por una alanina y los mutantes *ts2(98)*, *ts2(99)* y *ts2(112)* tienen el mismo cambio de valina por alanina en la posición 492. Dichos mutantes se han clonado en un vector de expresión bajo el control del promotor $\Phi 10$ de la RNA polimerasa de T7 para sobreproducir la proteína mutante correspondiente y estudiar la actividad alterada como resultado de la mutación.

También se han construido deleciones amino y carboxiterminales de la DNA polimerasa de $\Phi 29$, que se esquematizan en la Figura 15. Los distintos mutantes están bajo el control del promotor P_L del fago λ y la proteína delecionada correspondiente se sobreproduce. En las distintas proteínas mutantes se determinarán las actividades de iniciación, elongación y $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa de la proteína p2. Además de estas actividades, se puede determinar la interacción de las proteínas p2 mutantes con la proteína terminal p3, la interacción de la proteína p2 con el DNA, tanto de banda doble como de banda simple, la procesividad de la DNA polimerasa, el desplazamiento de banda y la fidelidad de copia. De esta forma, pretendemos mapear los distintos dominios funcionales de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ y correlacionarlos con la estructura de la proteína.

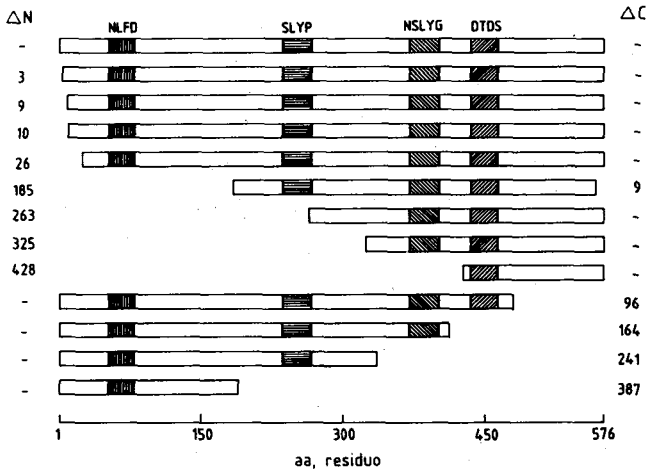


Figura 15. Deleciones amino y carboxi terminales de la DNA polimerasa de $\Phi 29$.

Se indican las distintas deleciones obtenidas (Zaballos, A., Mellado, R. P. y Salas, M., resultados no publicados).

7.7. Aislamiento de mutantes de la proteína terminal p3 por mutagénesis *in vitro* del gen 3. Efecto de las mutaciones sobre la formación del complejo de iniciación

Por manipulación *in vitro* de plásmidos recombinantes conteniendo el gen 3, se aislaron dos mutantes de la proteína p3 con algunos residuos de aminoácidos cambiados en el extremo carboxilo de la proteína; estos mutantes tienen una actividad reducida en la formación del complejo de iniciación (Mellado y Salas, 1982, 1983). Para proseguir en el estudio de la importancia del extremo carboxilo en la actividad de la proteína se construyeron mutantes de delección. Una delección de 4 aminoácidos reduce la actividad a un 50 % de la proteína normal en la formación del complejo de iniciación mientras que delecciones de 20 aminoácidos o mayores, conservando los 5 aminoácidos carboxi-terminales, eliminan la actividad de iniciación de las proteínas, lo que sugiere que la región entre los residuos 240 y 262 en el extremo carboxilo de la proteína p3, o parte de esta región, puede ser esencial para la función normal de la proteína (Zaballos y cols. 1986).

Se han construido también delecciones en el extremo amino de la proteína p3. Así, delecciones de hasta 13 aminoácidos reduce la actividad de iniciación de la proteína mutante a un 30 % de la actividad de la proteína normal, mientras que una delección de 17 aminoácidos da lugar a una proteína inactiva (Zaballos y cols. 1987). Estos resultados sugieren que la región comprendida entre los aminoácidos 14 y 18 de la proteína terminal podrían, bien formar parte de un centro activo de la proteína, o ser requeridos para mantener una conformación adecuada para la función de la proteína. Predicciones de estructura secundaria indican la existencia de una estructura en hélice α en el extremo amino de la proteína p3 (Escarmís y Salas, 1982). Dicha estructura se modificaría por la delección de los aminoácidos de las posiciones 14 a 17, lo que podría correlacionarse con la falta de actividad de la proteína p3 con la delección de 17 aminoácidos y la actividad de la proteína con la delección de 13 aminoácidos. De nuevo, la mutagénesis dirigida en la región correspondiente a los aminoácidos 14 a 18 debe dar luz sobre la relación estructura-función de la proteína terminal de $\Phi 29$.

Finalmente, para determinar la especificidad del residuo de serina en posición 232 de la proteína p3, implicada en el enlace al dAMP, dicho residuo de serina se ha cambiado a un residuo de treonina por mutagéne-

sis dirigida. No se detecta actividad de la proteína p3 mutante, lo que indica una especificidad muy alta en el sitio de enlace (Garmendia, C., Salas, M. y Hermoso, J. M., en preparación). Sin embargo, la proteína p3 mutante interacciona con la DNA polimerasa y con el DNA, lo que indica que la falta de actividad de la proteína p3 mutada se debe a un fallo en la reacción de iniciación propiamente dicha y no a un problema de interacción con los otros componentes del sistema.

Por mutagénesis dirigida se han introducido otros tres cambios independientes en la proteína terminal en la región próxima al enlace. Uno es el de la Ser₂₂₆ en Pro con objeto de eliminar la hélice α que precede al sitio del enlace; es de resaltar el hecho de que los dos aminoácidos que preceden y siguen a dicha serina, además de la propia serina, están conservados en la proteína terminal del fago Nf. Otro cambio es la Ser₂₂₃ en Pro que también destruye la hélice α anterior al sitio del enlace. Sin embargo, el hecho de que esta Ser no esté conservada en la proteína terminal del fago Nf hace pensar que este cambio es tolerable. Un tercer cambio es el de la Leu₂₂₀ en Pro que afectaría también la hélice α que precede al sitio del enlace. El hecho de que esta Leu esté conservada en el fago Nf hace suponer que el cambio a Pro no sea tolerable. Otros cambios interesantes a realizar en relación con el sitio activo en la reacción de iniciación son los dos aminoácidos que preceden y siguen a la Ser₂₃₂, ya que dichos aminoácidos están conservados en la proteína terminal del fago Nf.

8. OTRAS PROTEINAS VIRALES IMPLICADAS EN LA REPLICACION DEL DNA DE $\Phi 29$

8.1. Caracterización del gen 1. Sobreproducción de la proteína p1

La secuenciación de la fase de lectura abierta 6 (Yoshikawa e Ito, 1982) del mutante *sus1*(629) indica la presencia de una mutación en el nucleótido 28 de dicha fase de lectura por la cual el triplete CAA que codifica a Gln se convierte en un triplete sin sentido TAA. Por tanto, la fase de lectura 6 corresponde al gen 1. Para caracterizar y sobreproducir la proteína p1, se clonó un fragmento del DNA de $\Phi 29$ normal o del mutante *sus1*(629) en el plásmido de expresión pPLc28 bajo el control del promotor P_L del fago λ . Al inducir la expresión de los genes bajo el control del promotor P_L por subida de temperatura a 42°C se sobreproduce una proteína del peso molecular esperado para la proteína p1 (~10.000 dal-

tons), que no aparece en las células que contienen el plásmido en el que se ha insertado el gen 1 con la mutación *sus*. Dicha proteína representa el 4 % de la proteína total sintetizada en *E. coli*. Sin embargo, la proteína es muy insoluble, siendo solamente solubilizada por agentes desnaturantes como urea 4 M y cloruro de guanidina 2 M (Prieto, I. y Salas, M., resultados no publicados). Actualmente se están siguiendo dos caminos. Uno es tratar de renaturalizar la proteína y estudiar su posible actividad en el sistema de replicación de $\Phi 29$ *in vitro*. Otro es utilizar otro sistema de expresión que no dependa de una subida de temperatura, como el del promotor $\Phi 10$ de la RNA polimerasa del fago T7, para tratar de obtener proteína soluble.

Experimentos preliminales utilizando extractos de *B. subtilis* infectado con el mutante *sus1*(629) indican que la actividad de iniciación de dichos extractos es muy alta, lo que podría sugerir que la proteína p1 se une al DNA, interfiriendo de alguna manera *in vitro* con la iniciación de la replicación. Sin embargo, células infectadas con el mutante *sus1*(629) tienen una síntesis muy reducida del DNA viral, lo que sugiere que, *in vivo*, la proteína p1 es necesaria para la replicación del DNA de $\Phi 29$.

8.2. Caracterización del gen 5. Sobreproducción y purificación de la proteína p5

La secuencia de la fase de lectura 10 (Yoshikawa e Ito, 1982) del mutante *ts5*(219) indica la presencia de una mutación G→A en la posición 218 de dicha fase de lectura, por la que un triplete GGG que codifica a Gly se convierte en un triplete GAG que codifica a Glu. Este cambio produce una alteración de la estructura secundaria en el sitio de la mutación, ya que hace que desaparezca un giro β . La presencia de la mutación de la fase de lectura 10 indica que ésta corresponde al gen 5 que codifica a una proteína de peso molecular 13.000 daltons (Martín, G. y Salas, M. enviado a Gene).

Para caracterizar, sobreproducir y purificar la proteína p5, se clonó la fase de lectura 10 en el plásmido pPLc28 bajo el control del promotor P_L del fago λ . Después de inducir a 42°C, se marca una proteína con el peso molecular esperado, que tiene la misma movilidad electroforética que una proteína inducida en minicélulas de *B. subtilis* infectadas con $\Phi 29$ y que desaparece cuando se construye un mutante sin sentido por manipulación *in vitro* del gen 5 clonado (Martín y Salas, enviado a Gene).

La proteína p5 se ha purificado y se ha visto que tiene afinidad por DNA de banda simple y que protege a éste frente a degradación por nucleasas. También se ha purificado la proteína del mutante *ts5(219)* y se ha observado que es sensible a temperatura en su interacción con el DNA de banda simple y en la protección al DNA frente a digestión por nucleasas, lo que indica que dichas actividades son genuinas de la proteína p5 (Martín, G., Lázaro, J. M. y Salas, M., en preparación). Actualmente se está estudiando su posible papel en la replicación *in vitro* del DNA de $\Phi 29$. Es razonable pensar que su función *in vivo* sea unirse a la banda paterna de DNA desplazada para facilitar la replicación y quizás, también, protegerla frente a la degradación por las nucleasas.

8.3. Sobreproducción y purificación de la proteína p6

Para estudiar la función de la proteína p6 viral en la replicación del DNA de $\Phi 29$ se clonó un fragmento del DNA de $\Phi 29$ que contenía el gen 6 en el plásmido pPLc28 bajo el control del promotor P_L del fago λ . La proteína sobreproducida después de inducir a 42°C tiene un peso molecular de 12.000 por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico. La proteína p6 purificada tiene un peso molecular aparente de 23.000, lo que sugiere que la forma nativa de la proteína es un dímero (Pastrana y cols. 1985).

8.4. Papel de la proteína p6 en la iniciación de la replicación del complejo p3-DNA

Cuando la proteína p6 purificada se añade al sistema *in vitro* con las proteínas p2 y p3, p3-DNA como molde y 0.25 μM dATP- α - P^{32} , se estimula fuertemente la formación del complejo de iniciación p3-dAMP (Pastrana y cols. 1985). Cuando se aumenta la concentración de dATP, disminuye la estimulación por la proteína p6. Efectivamente, se demostró que el efecto de la proteína p6 es disminuir el valor de la K_m para el dATP, que pasa de 6 μM en ausencia de p6 a 1.2 μM en su presencia (Blanco y cols. 1986).

8.5. Papel de la proteína p6 en la elongación del complejo p3-dAMP

La proteína p6 también estimula la reacción de elongación limitada del complejo de iniciación p3-dAMP en presencia de ddCTP para dete-

ner la replicación en los nucleótidos 9 y 12 desde el extremo izquierdo y derecho del DNA de $\Phi 29$. Sin embargo, esta reacción sólo ocurre a concentración de dATP por encima de 1 μM . Las actividades en la proteína p6 que estimulan las reacciones de iniciación y elongación limitada en la replicación del DNA de $\Phi 29$ cosedimentan con el pico de la proteína p6 en un gradiente de glicerol, lo que sugiere que ambas actividades están presentes en la misma proteína (Blanco y cols. 1986). Cuando se permite una elongación posterior en ausencia de ddCTP se observa una estimulación similar por la proteína p6. Sin embargo, la estimulación de la elongación por la proteína p6 es dependiente de la concentración salina. A concentraciones de ClNa bajas (~ 20 mM) la proteína p6 prácticamente no estimula. A medida que se sube la concentración de ClNa aumenta la estimulación por la p6, debido al hecho de que la sal inhibe la replicación y la proteína p6 parece contrarrestar dicha inhibición. Por otra parte, la velocidad de replicación no se afecta por la proteína p6, ni tampoco los valores de la K_m para los nucleótidos. Por tanto, un posible papel para la proteína p6 en elongación es estimular la incorporación del primer nucleótido en el complejo de iniciación p3—dAMP. De hecho, se ha demostrado que éste es el paso que requiere la concentración alta de dATP en la replicación del DNA de $\Phi 29$ (Blanco, L., Bernad, A. y Salas, M., en preparación).

8.6. Unión de la proteína p6 a los extremos del DNA de $\Phi 29$

Para tratar de entender el mecanismo por el cual la proteína p6 estimula la replicación del complejo p3—DNA, se estudió la unión de la proteína a fragmentos de DNA de banda doble o simple por el ensayo de retraso en gel desarrollado por Wu y Crothers (1984). La proteína p6 se une a fragmentos de DNA de cadena doble, pero no a fragmentos de cadena simple, aunque aparentemente la unión a los fragmentos de DNA de cadena doble es inespecífica (Prieto y cols. 1988). Se estudió también la interacción con DNA por microscopía electrónica. La Figura 16 muestra fotografías electrónicas del fragmento ClaI B de 6,1 Kpb, que corresponde a la izquierda del DNA de $\Phi 29$, sin proteína p6 o con distintas cantidades de proteína. Como se ve, la proteína va recubriendo el DNA empezando por un extremo. Sin embargo, de nuevo no hubo especificidad en la interacción de la proteína p6 con el DNA de doble cadena.

También se estudió el efecto de la interacción de la proteína p6 sobre la topología de un plásmido relajado que contiene las secuencias de los

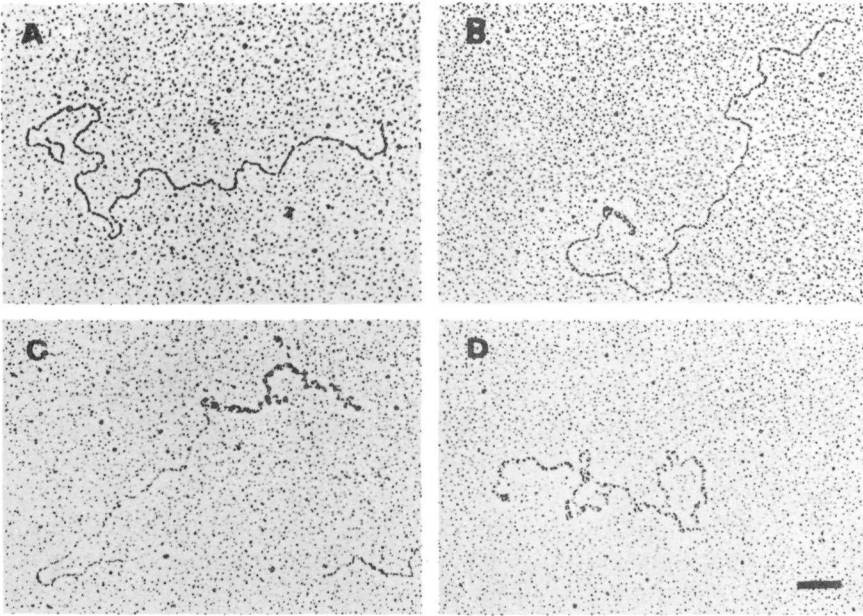


Figura 16. Microscopía electrónica de la proteína p6 unida al fragmento Cla I B del DNA de $\Phi 29$ (Prieto y cols. 1987).

extremos del DNA de $\Phi 29$ (pID13) o que carece de dichas secuencias (pKK223-3). Los plásmidos superenrollados se relajan por tratamiento con topoisomerasa I y, después de incubarlos con cantidades crecientes de proteína p6, se vuelven a tratar con topoisomerasa I para liberar cualquier tensión en el DNA inducida por la unión de la proteína p6. Cuando se someten estas muestras de DNA a electroforesis en gel de agarosa se observa la aparición de DNA superenrollado que depende de la dosis de proteína p6 con la que se ha incubado el DNA relajado. De nuevo, no hubo especificidad en esta interacción puesto que se obtienen resultados similares con ambos plásmidos. Mediante el uso de geles con cloroquina se pudo demostrar que el superenrollamiento inducido por la proteína p6 es positivo (Prieto y cols. 1988).

Finalmente y teniendo en cuenta que la proteína p6 estimula la iniciación de la replicación del DNA de $\Phi 29$, que comienza en ambos extremos, se estudió la interacción de la proteína p6 con fragmentos terminales o internos del DNA de $\Phi 29$ por experimentos de protección frente a la digestión con DNasa I (Galas y Schmitz, 1978). La Figura 17 muestra el patrón que se obtiene con el fragmento HindIII L de la derecha del DNA

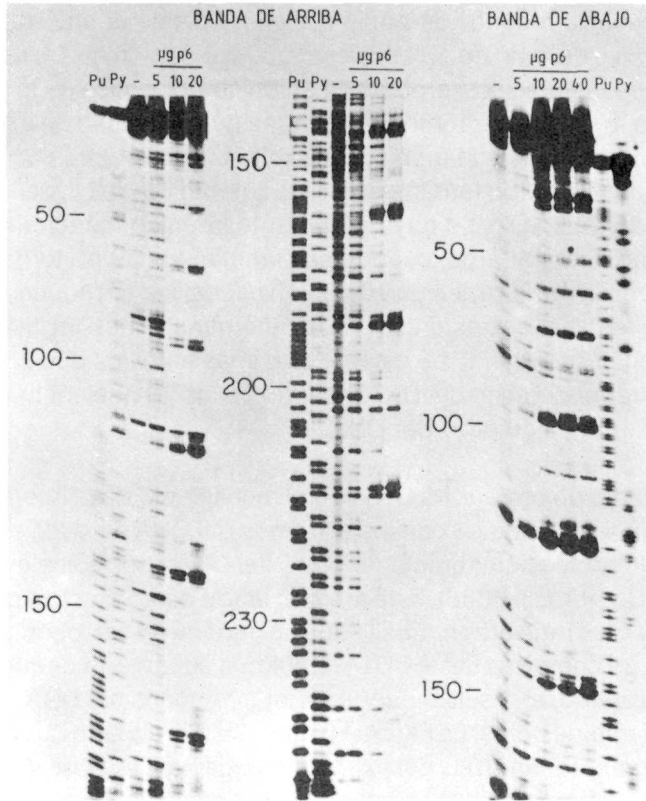


Figura 17. Protección por la proteína p6 del fragmento HindIII L, del extremo derecho del DNA de $\Phi 29$, frente a la digestión por la DNasa I.

Se muestran dos tiempos de electroforesis distintos con la banda de arriba del fragmento marcada con P^{32} en un extremo y un solo tiempo con la banda de abajo del fragmento marcada (Prieto y cols. 1988). Pu y Py indican reacciones de secuenciación para purinas y pirimidinas, respectivamente.

$\Phi 29$, marcado en el extremo 3' interno. Se puede observar la aparición de bandas de hipersensibilidad espaciadas unos 24 nucleótidos entre sí, que flanquean regiones protegidas. Un patrón similar se obtiene cuando se usa el fragmento HindIII L marcado en el extremo 5' interno o cuando se utiliza un fragmento de la izquierda del DNA de $\Phi 29$. Más aún, esta interacción es resistente a CINA 125 mM. Sin embargo, la interacción de la proteína p6 con un fragmento interno del DNA de $\Phi 29$ es sensible a CINA 75 mM, lo cual sugiere que hay secuencias específicas en los extremos del DNA de $\Phi 29$ que determinan una interacción específica de la proteína p6 con dichos extremos y dan lugar a una unión, aparentemente cooperativa, que se extiende a todo lo largo del fragmento.

La secuencia reconocida por la proteína p6 está dentro de los 73 pb del extremo izquierdo del DNA puesto que cuando dicha secuencia está unida a otra inespecífica, produce la unión característica de la p6 que se extiende a lo largo del fragmento, mientras que la secuencia inespecífica por sí sola no produce la unión de la proteína p6. Por otra parte, se pueden eliminar los 10 pb terminales del fragmento HindIII L, de la derecha del DNA de $\Phi 29$, sin que haya pérdida de la unión característica de la proteína p6. Sin embargo, cuando se eliminan los 59 pb terminales del mismo fragmento, la capacidad de unión específica se reduce, lo que sugiere que las secuencias críticas que determinan la especificidad en la interacción de la proteína p6 están localizadas entre los nucleótidos 10 y 59 del extremo derecho del DNA y dentro de los 73 nucleótidos terminales del extremo izquierdo del DNA.

Con objeto de profundizar más en el mecanismo de la interacción específica de la proteína p6 con los extremos del DNA de $\Phi 29$, se utilizó el método de protección frente a la rotura del DNA con radicales hidroxilo (Tullins y Dombroski, 1986). Este método utiliza como reactivo para hidrolizar el DNA los radicales hidroxilo que se generan *in situ* por reacción del H_2O_2 con un complejo Fe^{2+} -EDTA. Debido a su tamaño pequeño y falta de especificidad, el reactivo puede llegar a regiones del DNA muy próximas a la proteína unida. La Figura 18 muestra el resultado que se obtiene con el fragmento HindIII L, del extremo derecho del DNA de $\Phi 29$, marcado en una u otra de las dos bandas. Puede observarse la aparición de un patrón de bandas específico en el cual se protegen 4 bases de un modo regular con un espaciamiento de 12 bases. La Figura 19 muestra un resumen de los resultados de protección e hipersensibilidad del fragmento HindIII L por la proteína p6 frente a la degradación por la DNasa I y a la rotura por los radicales hidroxilo. La representación de estos últimos resultados en una proyección cilíndrica del DNA B sugiere que la proteína p6 se une alrededor del DNA (Figura 20).

Es interesante señalar que se requiere una cantidad de proteína p6 similar para estimular la replicación del DNA de $\Phi 29$ *in vitro* y para la interacción con el DNA, lo que sugiere que el significado biológico de dicha interacción sea facilitar la replicación. Un modo de estudiar dicha correlación es la construcción de mutantes en la proteína p6 y determinar si ambas actividades, la estimulación de la replicación y la interacción con el DNA, están afectadas en paralelo. Se ha construido un mutante de delección al que le faltan los 14 aminoácidos carboxi-terminales que han sido

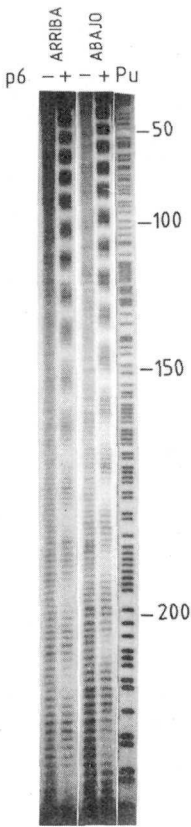


Figura 18. Protección por la proteína p6 del fragmento HindIII L frente a degradación con radicales hidroxilo.

Se muestran los resultados con la banda de arriba o la de abajo del fragmento marcada con P^{32} en un extremo. Pu indica la reacción de secuenciación para purinas.



Figura 19. Resumen de la protección por la proteína p6 del fragmento HindIII L frente a la digestión por la DNasa I y a la degradación por radicales hidroxilo.

Las flechas sólidas indican sitios de hipersensibilidad fuerte, las flechas vacías, sitios de menor hipersensibilidad y los corchetes zonas protegidas por la proteína p6 frente a la digestión por la DNasa I. Los recuadros indican regiones protegidas por la proteína p6 frente a degradación por radicales hidroxilo.

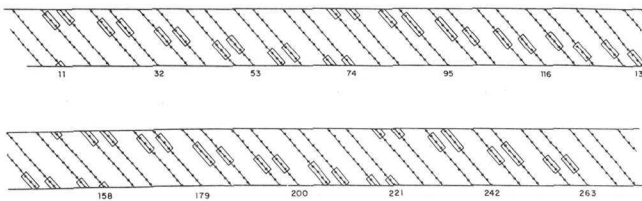


Figura 20. Resumen de la protección por la proteína p6 del fragmento HindIII L frente a la degradación con radicales hidroxilo. Proyección cilíndrica del DNA B.

Los recuadros indican regiones protegidas por la proteína p6.

sustituidos por 4 aminoácidos distintos. Esta proteína p6 mutante se une al DNA a una concentración menor (aproximadamente la mitad) que la proteína normal, lo que está de acuerdo con la ausencia de una serie de aminoácidos ácidos presentes en el extremo carboxilo de la proteína. Por otra parte, el patrón de unión de la proteína p6 mutante es idéntico al de la proteína normal y estimula de un modo similar la iniciación y elongación de la replicación del DNA de $\Phi 29$ (Otero, M. J. y Salas, M., resultados no publicados). La construcción de nuevos mutantes de delección, tanto en el extremo amino como en el carboxilo, debe ayudar a correlacionar la actividad de la proteína p6 en la replicación y su unión a los extremos del DNA.

Se ha indicado recientemente que la proteína p6 tiene alguna homología con la proteína DBP de adenovirus, que también está implicada en la replicación del DNA viral (Argos y cols. 1986). Sin embargo, la DBP de adenovirus es fundamentalmente una proteína que se une a DNA de banda simple, a diferencia de la proteína p6, aunque existe alguna evidencia que sugiere que la DBP de adenovirus se puede unir a los extremos de doble banda del DNA viral (Fowlkes y cols. 1979).

Además de estimular la replicación del DNA de $\Phi 29$, la proteína p6 inhibe la transcripción de los promotores tempranos C1 y C2, a la derecha del DNA de $\Phi 29$, pero no la de otros promotores tempranos de $\Phi 29$ (Whiteley y cols. 1986; Barthelemy, I., Mellado, R. P. y Salas, M., en preparación).

Teniendo en cuenta las propiedades de la proteína p6, se puede encontrar alguna similitud con la proteína HU, tipo histona, de *E. coli* y con la proteína de unión a DNA, tipo II (TFI), que se induce después de la infección de *B. subtilis* con el fago SPO1. Todas estas proteínas son muy abundantes (Carrascosa y cols. 1976; Rouvière-Yaniv y Gross, 1975; Geiduschek e Ito, 1982), de acuerdo con un papel estructural, e inhiben la transcripción (Whiteley y cols. 1986; Barthelemy y cols., en preparación; Losso y cols. 1982; Johnson y Geiduschek, 1972). Además, la proteína p6 y la proteína HU estimulan la replicación (Pastrana y cols., 1985; Blanco y cols. 1986; Dixon y Kornberg, 1984). Sin embargo, suero anti-p6 no reacciona con ninguna de las dos subunidades de la proteína HU y éstas no producen el patrón de protección frente a digestión con DNasa I característico de la proteína p6. Además, la proteína HU induce superenrollamiento negativo sobre DNA relajado (Rouvière-Yaniv y cols. 1979) mien-

tras que la proteína p6 da lugar a superenrollamiento positivo. Por otra parte, los resultados obtenidos con la proteína p6 indican que ésta se une al DNA de un modo distinto a otras proteínas conocidas. Muy recientemente se ha mostrado que la proteína represora Fur que se une al operador del operon aerobactina, controlado por Fe^{2+} , produce un patrón de protección frente a la degradación por radicales hidroxilo, similar al de la proteína p6, excepto que en el caso de la proteína Fur la protección es de 2 bases con una repetición cada 6 bases y este patrón sólo se extiende dentro de la región del operador (de Lorenzo, V., Giovannini, F., Herrero, M. y Neilands, J. B., enviado a EMBO J.).

8.7. Requerimiento de la proteína p17 en la replicación del DNA de $\Phi 29$

Cuando se trata el complejo p3—DNA con ClaI se producen dos fragmentos, A y B, de 13,1 y 6,1 Kpb, correspondientes a la derecha y a la izquierda del genoma, respectivamente. Si ambos fragmentos se ligan con DNA ligasa, el DNA resultante es capaz de transfectar protoplastos de *B. subtilis* de un modo similar al complejo p3—DNA original. Cuando se ligan los fragmentos ClaI B entre sí, el DNA resultante es capaz de replicarse en protoplastos de *B. subtilis*, lo que sugiere que la proteína p17, presente en el fragmento ClaI A, es dispensable.

Si se trata el complejo p3—DNA con PvuI, se producen 4 fragmentos, A, B, C y D, siendo los fragmentos B y C los de los extremos de la izquierda y derecha del DNA, respectivamente. El fragmento PvuI B contiene básicamente los mismos genes que el ClaI B y, de acuerdo con esto, el fragmento PvuI B ligado consigo mismo es capaz de replicarse en protoplastos de *B. subtilis*. Cuando se une el fragmento PvuI B con el C, que contiene el gen 17, la replicación es más eficiente, lo que sugiere que, si bien la proteína producto del gen 17 es dispensable, cuando está presente se estimula la replicación (Escarmís, C., Guirao, D. y Salas, M., en preparación). Estos resultados están de acuerdo con la síntesis retrasada de DNA que se obtiene después de la infección de *B. subtilis* con mutantes *sus* en el gen 17 (Carrascosa y cols. 1976). La purificación de la proteína p17 y su estudio *in vitro* dará más luz sobre la función de la proteína *in vivo* en la replicación del DNA de $\Phi 29$.

9. REQUERIMIENTOS DE MOLDE PARA LA REPLICACION DEL DNA DE Φ 29

9.1. Origen de replicación del DNA de Φ 29

Cuando el complejo p3-DNA se trata con proteinasa K se pierde su actividad como molde, lo que sugiere que la proteína terminal paterna es un requerimiento importante para la replicación del DNA de Φ 29. Sin embargo, no se requiere un DNA intacto ya que fragmentos del extremo derecho o izquierdo del DNA de Φ 29, con la proteína terminal paterna, son moldes activos para la replicación siempre que tengan un tamaño mínimo. Así, un fragmento de 26 pb es activo mientras que uno de 10 pb es inactivo. La actividad del último se restablece cuando se le liga una secuencia de DNA inespecífica lo que sugiere que la actividad baja del fragmento de 10 pb se debe a su pequeño tamaño y no a la falta de una secuencia específica (García y cols. 1984).

Cuando el complejo p3-DNA tratado con proteinasa K, que es inactivo como molde de replicación, se trata con piperidina para eliminar el péptido que queda en el extremo 5' después de digerir con proteinasa K, el DNA resultante es activo como molde, aunque la actividad es 5 a 10 veces menor que la del complejo p3-DNA. La actividad es debida a las secuencias terminales del DNA de Φ 29 puesto que los fragmentos HindIII B y L de los extremos del DNA de Φ 29, tratados con piperidina, pero no fragmentos internos, son moldes activos (Gutiérrez y cols. 1986b).

Para determinar la secuencia mínima de los extremos del DNA de Φ 29 requerida para la replicación, se clonaron los fragmentos BclI C y HindIII L, de 73 y 269 pb, del extremo izquierdo y derecho del DNA, respectivamente, en el plásmido pKK223-3 dando lugar al plásmido pID13 de tal forma que el tratamiento con AhaIII libera las secuencias terminales del DNA de Φ 29 en los extremos de los fragmentos de DNA. Estos fragmentos son activos en las reacciones de iniciación y elongación, pero no el plásmido circular o el plásmido linearizado con HindIII que deja las secuencias terminales del DNA de Φ 29 lejos de los extremos del DNA. La iniciación tiene lugar específicamente en el extremo de los fragmentos, como ocurre con el complejo p3-DNA, aunque la actividad es ~15 % de la obtenida con p3-DNA (Gutiérrez y cols. 1986a) y se requiere una mayor cantidad de proteína p3 libre que cuando se usa p3-DNA,

probablemente debido a que en el caso del p3-DNA, la presencia de la proteína terminal paterna en el extremo del DNA facilita la interacción con la proteína p3 libre.

A partir del plásmido pID13 se han obtenido deleciones, bien por tratamiento con nucleasas de restricción específicas como por tratamiento con la exonucleasa Bal31, que dejan secuencias de distinta longitud de los extremos del DNA de $\Phi 29$ en el extremo de fragmentos de DNA. La Figura 21 resume los resultados obtenidos, pudiéndose observar que la secuencia de los 12 pb terminales del extremo derecho o izquierdo del DNA de $\Phi 29$ es suficiente para determinar actividad del DNA como molde en la replicación dependiente de la proteína terminal libre.

EXTREMO DERECHO		ACTIVIDAD
pID13	AAAGTA---//-----AATAAGC ²⁷⁴ TT_____	+
pDΔ59	AAAGTA---//-----TTCGACA ⁵⁹ AG_____	+
pDΔ34	AAAGTA---//-----ACCATT ³⁴ TCC_____	+
mDΔ25	AAAGTA---//-----ACAACAT ²⁵ AC_____	+
mDΔ22	AAAGTA---//-----ACAACA ²² _____	+
mDΔ12	AAAGTAGGGT ¹² AC_____	+
pDΔ10	AAAGTAGGGT ¹⁰ _____	-
pITR	AAAGT ⁶ A_____	-
EXTREMO IZQUIERDO		
pID13	AAAGTA-----//-----ACCATGAT ⁷⁷ C_____	+
pIΔ46	AAAGTA-----//-----AATATCG ⁴⁶ AC_____	+
pIΔ12	AAAGTAAGCCCC ¹² _____	+
pITR	AAAGT ⁶ A_____	-

Figura 21. Deleciones en los orígenes de replicación del DNA de $\Phi 29$.

Se indican a la izquierda los nombres de los distintos plásmidos usados (Gutiérrez, J. y Salas, M., en preparación).

Para determinar las bases, dentro de las 12 pb terminales, que determinan la actividad como molde, se han introducido mutaciones, bien por mutagénesis dirigida o por mutagénesis al azar. En la Figura 22 puede verse que el cambio de la 2^a ó 3^a A por una C inactiva al molde, mientras que otros cambios son tolerados total o parcialmente. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que, más allá de la repetición terminal invertida de 6 pb, la secuencia en el extremo derecho e izquierdo del DNA de $\Phi 29$ es distinta (ver Figura 22) y, sin embargo, ambos extremos son activos como moldes en la replicación dependiente de proteína p3 libre.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Actividad
EXTREMO DERECHO	A	A	A	G	T	A	G	G	G	T	A	C	+
EXTREMO IZQUIERDO	A	A	A	G	T	A	A	G	C	C	C	C	+
R161		C											-
H7			C										-
PM3											G		+
PM4						C					G		±
PM5					G								+
PM9								G					+
PM12								A					+
PM21								T	A				+
PM22									A		G		±
PM27					T						G		+
PM31			T								G		±
PM36								A			G		+
PM37									T				+
PM42								G		A			+
PM46										T			+

Figura 22. Mutaciones puntuales en el origen de replicación izquierdo del DNA de $\Phi 29$.

Se indican a la izquierda los nombres de los distintos plásmidos usados (Gutiérrez, J. y Salas, M., en preparación).

A pesar de que, como se ha visto anteriormente, se puede obtener replicación específica en ausencia de la proteína terminal paterna en el DNA, ésta es sólo ~ 15 % de la que se obtiene en su presencia lo que sugiere que la proteína terminal paterna en los extremos del DNA es importante, aunque no es un requerimiento absoluto. La relevancia de la proteína terminal paterna se demostró también utilizando como moldes los complejos proteína terminal-DNA de los fagos $\Phi 15$, PZA, Nf, B103 y GA-1 o los DNAs correspondientes tratados con piperidina, en la reacción de iniciación *in vitro* con las proteínas p2 y p3 de $\Phi 29$. La actividad molde de los complejos proteína terminal-DNA de los fagos $\Phi 15$ y PZA, que tienen una proteína terminal muy relacionada a la de $\Phi 29$, es similar a la del complejo p3-DNA y la actividad disminuye en todos los casos cuando los DNAs se tratan con piperidina. La actividad molde de los complejos proteína terminal-DNA de los fagos Nf, B103 y GA-1, con una proteína terminal mucho menos relacionada (Nf y B103) o nada relacionada (GA-1) a la de $\Phi 29$ es muy baja (Nf y B103) o indetectable (GA-1). Sin embargo, cuando estos DNAs se tratan con piperidina para eliminar la proteína terminal paterna, se obtiene actividad al mismo nivel que con el DNA de $\Phi 29$ libre de proteína (Gutiérrez y cols. 1986b). Estos resultados sugieren que la presencia de una proteína terminal relacio-

nada a la de $\Phi 29$ permite la reacción de iniciación, probablemente por interacción proteína-proteína, mientras que la presencia de una proteína terminal no relacionada evita dicha interacción. La eliminación de la proteína terminal relacionada a la de $\Phi 29$ hace disminuir la actividad molde, lo que sugiere que la interacción de la proteína terminal libre con el DNA es menos eficiente que la interacción con la proteína terminal paterna. Cuando se elimina la proteína terminal no relacionada a la de $\Phi 29$ aumenta la actividad molde al permitir la interacción proteína-DNA.

La Figura 23 muestra la secuencia de los 12 nucleótidos terminales de los extremos izquierdo y derecho de los DNAs de los fagos $\Phi 29$, $\Phi 15$, Nf, B103 y GA-1. En el extremo izquierdo la secuencia de $\Phi 29$, $\Phi 15$, PZA, Nf y B103 es idéntica, variando la secuencia de 5 bases en el DNA de GA-1. En el extremo derecho, la secuencia de $\Phi 29$, $\Phi 15$ y PZA es idéntica, hay una variación de 2 y 1 nucleótidos en Nf y B103, respectivamente, mientras que la secuencia del DNA de GA-1 varía en 8 nucleótidos. Puesto que en el experimento descrito anteriormente en que se utilizaron los DNAs de los distintos fagos tratados con piperidina no se aislaron los fragmentos correspondientes a los extremos izquierdo y derecho, no se puede saber si todos los cambios son tolerados o solamente los que ocurren en uno de los extremos.

	Extremo izquierdo	Extremo derecho
$\Phi 29$	AAAGTAAGCCCC	AAAGTAGGGTAC
$\Phi 15$		
PZA		
Nf		A T
B103		T
GA-1	TAG T A	TAGATTCC

Figura 23. Comparación de las secuencias de nucleótidos en los extremos de los DNAs de fagos relacionadas a $\Phi 29$.

Las secuencias de nucleótidos de los extremos del DNA de $\Phi 29$ se tomaron de Escarmis y Salas (1981) y de Yoshikawa y cols. (1981), las del DNA de $\Phi 15$, Nf y GA-1 de Yoshikawa y cols. (1985), las del DNA de PZA de Paçes y cols. (1985, 1986a) y las del DNA de B103 de Gutiérrez y cols. (1986b). Sólo se indican los nucleótidos que difieren de la secuencia del DNA de $\Phi 29$.

9.2. Origen de replicación del DNA de adenovirus

De un modo similar a $\Phi 29$, el DNA de adenovirus libre de proteína, pero no el tratado con proteinasa K, sirve de molde en la replicación del DNA viral (Tamanoi y Stillman, 1982). Por otra parte, se clonaron las secuencias terminales del DNA de adenovirus y se encontró que éstos no son activos cuando están presentes en un DNA superenrollado o en un DNA lineal con las secuencias terminales del DNA de adenovirus en el interior de la molécula. Como en el caso de $\Phi 29$, la secuencia terminal de adenovirus tiene que estar localizada muy próxima al extremo del DNA.

También se construyeron deleciones para determinar la longitud de los extremos requerida para la reacción de iniciación. No se detecta disminución en la actividad molde cuando el DNA contiene secuencias terminales del DNA de adenovirus mayores de 50 pb. Con deleciones mayores la actividad disminuye mientras que la actividad se pierde por completo cuando el DNA contiene menos de 20 pb de la secuencia terminal de adenovirus. Por otra parte, la deleción de varios nucleótidos de la secuencia terminal destruye la actividad molde. De estos resultados se concluye que los 20 pb terminales (dominio I) constituyen la región mínima requerida de un modo absoluto para la iniciación y que los 30 pb adyacentes (dominio II) se requieren para la utilización eficiente del origen (Guggenheimer y cols. 1984). Este último dominio corresponde a parte del sitio de interacción del factor NFI que ya se ha comentado.

Los 20 pb terminales están muy conservados entre DNAs de distintos serotipos de adenovirus. En particular, una secuencia de 10 pb ATAATA TACC presente en la región entre el nucleótido 9 y 18 desde el extremo está perfectamente conservada en todos los DNAs de los adenovirus humanos. Para determinar la importancia de dicha secuencia se construyeron mutantes puntuales. El cambio de los nucleótidos 13 y 14 de TA a GG reduce significativamente la actividad molde (Tamanoi y Stillman, 1983), así como el cambio de los nucleótidos 17 y 18 de CC a TT (Challberg y Rawlins, 1984). Sin embargo, el cambio en el nucleótido 4 que está fuera de la región conservada, no afecta la actividad (van Bergen y cols. 1983). Estos resultados sugieren que la región entre la secuencia conservada y la secuencia terminal constituye un espaciador y que la alteración de este espaciador no afecta la actividad molde.

9.3. Función de la repetición terminal invertida en la replicación de los DNAs con proteína terminal

De los resultados que se han comentado en los apartados 9.1 y 9.2 parece que la repetición terminal invertida no es el origen de replicación ya que, en el caso de $\Phi 29$, éste se extiende más de los 6 pb de dicha repetición y en el caso de adenovirus, el origen de replicación es menor de los ~ 100 pb de la repetición terminal invertida.

Por otra parte, como ya se comentó, el tamaño de las repeticiones terminales invertidas en los distintos sistemas va desde 6 pb hasta 614 pb. Un papel que se ha propuesto para la repetición terminal invertida de adenovirus es la de servir de origen de replicación de la banda paterna desplazada mediante la formación de una estructura en forma de "asa de sartén" por apareamiento de las bases correspondientes a la repetición terminal invertida. Mediante experimentos *in vivo* utilizando las secuencias correspondientes a la repetición terminal invertida clonada en plásmidos se han obtenido resultados consistentes con el modelo que implica la estructura en forma de "asa de sartén" en la replicación del DNA de adenovirus *in vivo* (Hay y cols. 1984). Como se vio anteriormente, en el caso del DNA de $\Phi 29$, la repetición terminal invertida es necesaria pero no suficiente para determinar especificidad como origen de replicación.

10. MODELO PARA LA REPLICACION DEL DNA DE $\Phi 29$

La Figura 24 muestra el modelo actual de la replicación del DNA de $\Phi 29$ iniciada por la proteína terminal. Una molécula de proteína terminal p3 libre forma un complejo con la DNA polimerasa p2 en presencia de iones NH_4^+ y el complejo p2-p3 se localiza en cualquiera de los dos extremos del DNA por interacción proteína-proteína y proteína-DNA. En presencia de dATP la DNA polimerasa cataliza la formación de un complejo covalente entre el grupo OH del residuo de serina 232 en la proteína p3 y 5'dAMP. Esta reacción es estimulada por la proteína p6, que se une a los extremos del DNA de $\Phi 29$ y disminuye el valor de la Km para el dATP. El complejo de iniciación p3-dAMP es elongado por la propia DNA polimerasa que probablemente permanece asociada en un complejo de replicación. Los iones NH_4^+ estimulan unas tres veces la velocidad de elongación. La proteína p6 estimula la elongación en un proceso que depende de la concentración salina, siendo el requerimiento de p6 mayor a con-

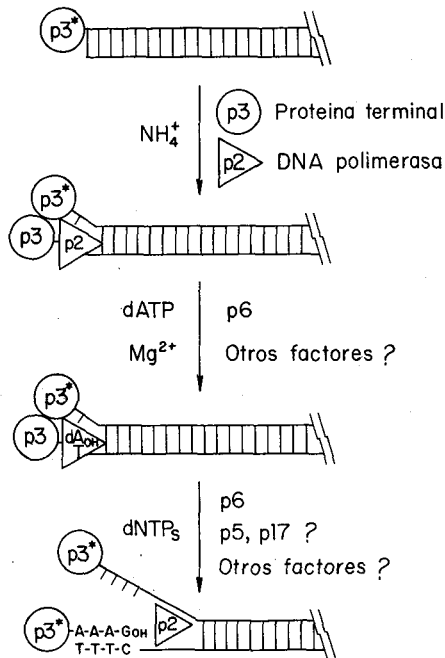


Figura 24. Modelo de replicación del DNA de $\Phi 29$.

centraciones de sal más próximas a las fisiológicas. Puesto que la proteína $p6$ no afecta la velocidad de replicación, un posible modo de acción de la proteína sería estimular la incorporación del primer nucleótido al complejo de iniciación $p3$ - $dAMP$. La proteína viral $p5$, que se une a DNA de banda simple, podría ayudar a mantener la banda paterna desplazada y a protegerla frente a degradación por las nucleasas. En la actualidad se desconoce el papel de las proteínas virales $p1$ y $p17$, así como la posible implicación de otras proteínas virales o celulares.

Usando un sistema mínimo con la proteína terminal y la DNA polimerasa se obtiene DNA de longitud unidad de un modo muy procesivo. La DNA polimerasa de $\Phi 29$ es, por tanto, una polimerasa muy procesiva que, además, es capaz de producir desplazamiento de banda, por lo que debe tener actividad tipo helicasa. Por otra parte, es una DNA polimerasa peculiar puesto que, no sólo cataliza la unión de un nucleótido al grupo $3'OH$ de otro nucleótido, como cualquier otra DNA polimerasa, sino que también cataliza la unión de un nucleótido, $dAMP$, al grupo OH de un residuo de serina específico de la proteína terminal. Además, como otras

DNA polimerasas, tiene actividad 3'→5' exonucleasa. Es realmente notable que una DNA polimerasa de tamaño tan pequeño, 68.000 daltons, sea capaz de realizar tantas funciones. En el caso de otras DNA polimerasas, las funciones de procesividad, desplazamiento de banda e incluso en algunos casos, la actividad 3'→5' exonucleasa, es llevada a cabo por otras proteínas accesorias de la DNA polimerasa.

Una pregunta que aún no se ha contestado en la replicación del DNA de $\Phi 29$ es cómo se inicia la replicación en la banda paterna que se desplaza. Si dicha banda llega a desplazarse antes que se inicie la replicación en el otro extremo, se podría formar una estructura en forma de "asa de sartén" a través de la repetición terminal invertida de 6 nucleótidos, que podría ser estabilizada por la proteína terminal y suministrar así un origen de replicación. Otra posibilidad es que la replicación en el extremo opuesto empiece antes que la banda paterna haya sido totalmente desplazada, usando por tanto un origen de replicación normal. Por otra parte, aunque el modelo que se muestra en la Figura 24 presenta un DNA lineal, una posibilidad alternativa es la formación de moléculas de DNA circulares por interacción de las proteínas terminales en los extremos del DNA. Esto podría explicar por qué la iniciación no ocurre simultáneamente en los dos extremos del DNA *in vivo*. Además, la existencia de la banda paterna desplazada como un círculo mantenido por interacción proteína-proteína podría suministrar un mecanismo para la iniciación de su replicación.

El sistema de adenovirus en que la replicación es iniciada por la proteína terminal es, con el de $\Phi 29$, el mejor estudiado, y comparte con él muchas analogías. Una de las mayores diferencias es que la DNA polimerasa de adenovirus no parece ser capaz de sintetizar DNA de longitud unidad y requiere para ello la actividad topoisomerasa I. Sin embargo, este requerimiento podría ser debido al hecho de que el DNA de adenovirus tiene aproximadamente el doble del tamaño del DNA de $\Phi 29$, más que a una diferencia en la DNA polimerasa de adenovirus respecto a la de $\Phi 29$.

Aunque la replicación en otros sistemas de ácidos nucleicos con proteína terminal ha sido menos estudiado o no se ha estudiado, parece razonable proponer que la iniciación de la replicación mediada por proteína será un mecanismo general de iniciar la replicación en dichos sistemas.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a las personas que han estado implicadas en los trabajos relacionados con la iniciación de la replicación del DNA de Φ 29 mediante la proteína terminal que son, por orden alfabético: I. Barthelémy, A. Bernad, L. Blanco, M. A. Blasco, C. Escarmís, J. A. García, C. Garmendia, D. Guirao, J. Gutiérrez, J. M. Hermoso, M. R. Inciarte, J. M. Lázaro, G. Martín, R. P. Mellado, E. Méndez, J. Ortín, M. J. Otero, E. Parés, R. Pastana, M. A. Peñalva, I. Prieto, M. Serrano, J. M. Sogo, C. Vázquez, L. Villar, J. Vinós y A. Zaballos. Asimismo quiero agradecer a las personas que aislaron mutantes *ts* y *sus* de Φ 29, que contribuyeron de un modo notable al desarrollo de este trabajo: A. Camacho, F. Jiménez, F. Moreno y A. Talavera, así como a todas las personas que de algún modo contribuyeron al trabajo realizado en mi laboratorio sobre el bacteriófago Φ 29, cuyos nombres quedan reflejados en la bibliografía, y a Margarita Corral y Carmen Hermoso quienes con su eficiencia facilitaron en todo momento estos trabajos. Mi agradecimiento también a mis maestros durante mis fases doctoral y post-doctoral, Alberto Sols y Severo Ochoa, por sus enseñanzas. Finalmente, y muy en especial, quiero expresar mi agradecimiento a Eladio Viñuela con quien compartí los momentos difíciles de formación del grupo de trabajo sobre el bacteriófago Φ 29, los momentos agradables del descubrimiento y caracterización de la proteína terminal de Φ 29, y gracias a cuya ayuda y apoyo constantes he podido llegar a esta Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

BIBLIOGRAFIA

- Aleström, P., Akusjärvi, G., Pettersson, M. y Pettersson, U. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 13492.
- Anderson, D. L., Hickman, D. D. y Reilly, B. E. (1966). *J. Bacteriol.* 91, 2081.
- Argos, P., Tucker, A. D. y Philipson, L. (1986). *Virology* 149, 208.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrel, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satechwell, S. C., Seguin, C., Tuffnell, P. S. y Barrell, B. G. (1984). *Nature* 263, 211.
- Bamford, D. H., McGraw, T., MacKenzie, G. y Mindich, L. (1983). *J. Virol.* 47, 311.
- Bamford, D. H. y Mindich, L. (1984). *J. Virol.* 50, 309.
- Barthelemy, I., Mellado, R. P. y Salas, M. (1987). *Nucl. Acids Res.* 15, 7781.
- Bedinger, P., de Hostos, E. L., Leon, P. y Walbot, V. (1986). *Mol. Gen. Genet.* 205, 206.
- Bernad, A., Zaballos, A., Salas, M. y Blanco, L. (1987). *EMBO J.* 6, 4219.
- Bjornsti, M. A., Reilly, B. E. y Anderson, D. L. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5861.
- Bjornsti, M. A., Reilly, B. E. y Anderson, D. L. (1982). *J. Virol.* 41, 508.
- Bjornsti, M. A., Reilly, B. E. y Anderson, D. L. (1983). *J. Virol.* 45, 383.
- Blanco, L., García, J. A., Peñalva, M. A. y Salas, M. (1983). *Nucl. Acids Res.* 11, 1309.
- Blanco, L., Bernad, A. y Salas, M. (1988). DNA replication and mutagenesis. En prensa.

- Blanco, L., García, J. A. y Salas, M. (1984). *Gene* 29, 33.
- Blanco, L. y Salas, M. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5325.
- Blanco, L. y Salas, M. (1985a). *Nucl. Acids Res.* 13, 1239.
- Blanco, L. y Salas, M. (1985b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6404.
- Blanco, L. y Salas, M. (1986). *Virology* 153, 179.
- Blanco, L., Gutiérrez, J., Lázaro, J. M., Bernad, A. y Salas, M. (1986). *Nucl. Acids Res.* 14, 4923.
- Blanco, L., Prieto, I., Gutiérrez, J., Bernad, A., Lázaro, J. M., Hermoso, J. M. y Salas, M. (1987). *J. Virol.* 61, 3983.
- Brown, D. T., Westpahl, M., Burlingham, B. T., Winterhoff, V. y Doerfler, W. (1975). *J. Virol.* 16, 366.
- Brutlag, D., Schekman, R. y Kornberg, A. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2826.
- Camacho, A., Jiménez, F., de la Torre, J., Carrascosa, J. L., Mellado, R. P., Vázquez, C., Viñuela, E. y Salas, M. (1977). *Eur. J. Biochem.* 73, 39.
- Camacho, A., Jiménez, F., Viñuela, E. y Salas, M. (1979). *J. Virol.* 29, 540.
- Carrascosa, J. L., Camacho, A., Moreno, F., Jiménez, F., Mellado, R. P., Viñuela, E. y Salas, M. (1976). *Eur. J. Biochem.* 66, 229.
- Challberg, M. D., Ostrove, J. M. y Kelly, T. J. Jr. (1982). *J. Virol.* 41, 265.
- Challberg, M. D. y Rawlins, D. R. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 100.
- Crawford, N. M. y Baltimore, D. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7452.
- Daubert, S. D. y Bruening, G. (1984). *Methods Virol.* 8, 347.
- Davis, T. N. y Cronan, E. J. Jr. (1983). *Virology* 126, 600.
- Davison, A. J. y Scott, J. E. (1986). *J. Gen. Virol.* 67, 1759.
- De Jong, P. J., Kwant, M. M., Van Driel, W., Jansz, H. S. y van der Vliet, P. C. (1982). *Virology* 124, 45.
- De Lucia, P. y Cairns, J. (1969). *Nature* 224, 1164.
- De Vries, E., van Driel, W., van den Heuvel, S. J. L. y van der Vliet, P. C. (1987). *EMBO J.* 6, 161.
- Desiderio, S. V. y Kelly, T. J. Jr. (1981). *J. Mol. Biol.* 145, 319.
- Dixon, N. E. y Kornberg, A. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 424.
- Earl, P. L., Jones, E. V. y Moss, B. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3659.
- Enomoto, T., Lichy, J. H., Ikeda, J. E. y Hurwitz, J. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6779.

- Escarmís, C. y Salas, M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1446.
- Escarmís, C. y Salas, M. (1982). *Nucl. Acids Res.* 10, 5785.
- Escarmís, C., Gómez, A., García, E., Ronda, C., López, R. y Salas, M. (1984). *Virology* 133, 166.
- Escarmís, C., García, P., Méndez, E., López, R., Salas, M. y García, E. (1985). *Gene* 36, 341.
- Fowlkes, D. M., Lord, S. T., Linne, T., Pettersson, U. y Philipson, L. (1979). *J. Mol. Biol.* 132, 169.
- Fučík, V., Grunow, E., Grünnerová, H., Hostomsky, Z. y Zdražil, S. (1980). DNA Recombination, Interactions and Repair. Zdražil, S. y Sponar, J. eds. Pergamon, New York. p. 111.
- Galas, D. J. y Schmitz, A. (1978). *Nucl. Acids Res.* 5, 3157.
- García, J. A., Carrascosa, J. L. y Salas, M. (1983a). *Virology* 125, 18.
- García, E., Gómez, A., Ronda, C., Escarmís, C. y López, R. (1983b). *Virology* 128, 92.
- García, J. A., Pastrana, R., Prieto, I. y Salas, M. (1983c). *Gene* 21, 65.
- García, J. A., Peñalva, M. A., Blanco, L. y Salas, M. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 80.
- García, P., Hermoso, J. M., García, J. A., García, E., López, R. y Salas, M. (1986a). *J. Virol.* 58, 31.
- García, E., Ronda, C., García, P. y López, R. (1986b). *Microbiología* 2, 115.
- Garvey, K. J., Yoshikawa, H. e Ito, J. (1985). *Gene* 40, 301.
- Geiduschek, E. P. e Ito, J. (1982). *The Molecular Biology of Bacilli*. Dubnau, D. A., ed. Academic Press 1, 203.
- Gerlich, W. H. y Robinson, W. S. (1980). *Cell* 21, 801.
- Guggenheimer, R. A., Nagata, K., Lindenbaum, J. y Hurwitz, J. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 7807.
- Guo, P., Bailey, S., Bodley, J. W. y Anderson, D. L. (1987a). *Nucl. Acids Res.* 15, 7081.
- Guo, P., Peterson, C. y Anderson, D. L. (1987b). *J. Mol. Biol.* 197, 229.
- Gutiérrez, J., García, J. A., Blanco, L. y Salas, M. (1986a). *Gene* 43, 1.
- Gutiérrez, J., Vinós, J., Prieto, I., Méndez, E., Hermoso, J. M. y Salas, M. (1986b). *Virology* 155, 474.
- Hagen, E. W., Reilly, B. E., Tosi, M. E. y Anderson, D. L. (1976). *J. Virol.* 19, 501.
- Harding, N. E. e Ito, J. (1980). *Virology* 104, 323.

- Harding, N. E., Ito, J. y David, G. S. (1978). *Virology* 84, 279.
- Hay, R. T., Stow, N. D. y McDougall, I. M. (1984). *J. Mol. Biol.* 175, 493.
- Hellen, C. V. T. y Cooper, J. I. (1987). *J. Gen. Virol.* 68, 2913.
- Henney, D. J. y Hoch, J. A. (1980). *Microbiol. News* 44, 57.
- Hermoso, J. M. y Salas, M. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6425.
- Hermoso, J. M., Méndez, E., Soriano, F. y Salas, M. (1985). *Nucl. Acids Res.* 13, 7715.
- Hinton, D. M., Richardson, R. W. y Nossal, N. G. (1987). *DNA Replication and Recombination*. Alan R. Liss, New York, 47, 173.
- Hirochika, H. y Sakaguchi, R. (1982). *Plasmid* 7, 59.
- Hirochika, K., Nakamura, K. y Sakaguchi, K. (1984). *EMBO J.* 3, 761.
- Hirokawa, H. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1555.
- Hirokawa, H., Matsumoto, K. y Ohashi, M. (1982). *Microbiology*. Schlessinger, ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C. p. 45.
- Hishinuma, F., Nakamura, K., Hirai, K., Nishizawa, R., Gunge, N. y Maeda, T. (1984). *Nucl. Acids Res.* 12, 7581.
- Hsieh, J. C., Jung, G., Leavitt, M. C. e Ito, J. (1987). *Nucl. Acids Res.* 15, 8999.
- Huang, C. C., Hearst, J. E. y Alberts, B. M. (1981). *J. Biol. Chem.* 206, 4087.
- Huberman, J. A. (1981). *Cell* 23, 647.
- Ikeda, J. E., Enomoto, T. y Hurwitz, J. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 884.
- Inciarte, M. R., Salas, M. y Sogo, J. M. (1980). *J. Virol.* 34, 187.
- Ito, J. (1978). *J. Virol.* 28, 895.
- Jaegle, M., Wellink, J. y Goldbach, R. (1987). *J. Gen. Virol.* 68, 627.
- Jiménez, F., Camacho, A., de la Torre, J., Viñuela, E. y Salas, M. (1977). *Eur. J. Biochem.* 73, 57.
- Johnson, G. G. y Geiduschek, E. P. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 3571.
- Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Rosenfeld, P. J., Kelly, T. J. y Tjian, R. (1987). *Cell* 48, 79.
- Kallin, B., Sternan, L., Saemundssen, A. K., Luka, J., Jornvall, H., Eriksson, B., Tao, P. Z., Nilsson, M. T. y Klein, G. (1985). *J. Virol.* 54, 561.
- Kelly, T. J. Jr. y Lechner, R. L. (1979). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 721.
- Kemble, R. J. y Thompson, R. D. (1982). *Nucl. Acids Res.* 10, 8181.

- Khan, N. W., Wright, G. E., Dudycz, L. W. y Brown, N. C. (1984). *Nucl. Acids Res.* 12, 3695.
- Khan, N. W., Wright, G. E., Dudycz, L. W. y Brown, N. C. (1985). *Nucl. Acids Res.* 13, 6331.
- Kikuchi, Y., Hirai, K. e Hishinuma, F. (1984). *Nucl. Acids Res.* 12, 5685.
- King, A. M. Q., Sangar, D. V., Harris, T. J. R. y Brown, F. (1980). *J. Virol.* 34, 627.
- Kistler, H. C. y Leong, S. A. (1986). *J. Bacteriol.* 167, 587.
- Kitada, K. e Hishinuma, F. (1987). *Mol. Gen. Genet.* 206, 377.
- Knippers, R. (1970). *Nature* 228, 1050.
- Knopf, K. W. (1979). *Eur. J. Biochem.* 98, 231.
- Knopf, K. W. (1987). *J. Gen. Virol.* 68, 1429.
- Koepsel, R. R., Murray, R. W., Rosenblum, W. R. y Khan, S. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6845.
- Kornberg, T. y Gefter, M. L. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 761.
- Kornberg, A. (1980). *DNA Replication*, W. H. Freeman and Co.
- Kornberg, A. (1982). *Supplement to DNA Replication*, W. H. Freeman and Co.
- Kornberg, A. (1987). *J. Cell Sci. Suppl.* 7, 1.
- Kouzarides, T., Baukier, A. T., Satchwell, S. C., Weston, K., Tomlinson, P. y Barrell, G. S. (1987). *J. Virol.* 61, 125.
- Larder, B. A., Kemp, S. D. y Darby, G. (1987). *EMBO J.* 6, 169.
- Leavitt, M. C. e Ito, J. (1987). *Nucl. Acids Res.* 15, 5251.
- Lechner, R. L. y Kelly, T. J. Jr. (1977). *Cell* 12, 1007.
- Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S. y Kornberg, A. (1958). *J. Biol. Chem.* 233, 163.
- Levings III, C. S. y Sederoff, R. R. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4055.
- Lichy, J. H., Horwitz, M. S. y Hurwitz, J. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2678.
- Lichy, J. H., Field, J., Horwitz, M. S. y Hurwitz, J. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5225.
- Losso, M. A., Miano, A., Gianfranceschi, G. L. y Gualerzi, C. D. (1986). *Biochem. Inst.* 5, 423.
- Mackenzie, J. M., Neville, M. M., Wright, G. E. y Brown, N. E. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 512.
- Matsumoto, K., Saito, T. e Hirokawa, H. (1983). *Mol. Gen. Genet.* 191, 26.

- Matsumoto, K., Kim, C. I., Urano, S., Ohashi, H. e Hirokawa, H. (1986). *Virology* 152, 32.
- Meinhardt, F., Kempken, F. y Esser, K. (1986). *Curr. Genet.* 11, 243.
- Mellado, R. P., Moreno, F., Viñuela, E., Salas, M., Reilly, B. E. y Anderson, D. L. (1976). *J. Virol.* 19, 495.
- Mellado, R. P., Peñalva, M. A., Inciarte, M. R. y Salas, M. (1980). *Virology* 104, 84.
- Mellado, R. P. y Salas, M. (1982). *Nucl. Acids Res.* 10, 5773.
- Mellado, R. P. y Salas, M. (1983). *Nucl. Acids Res.* 11, 7397.
- Méndez, E., Ramírez, G., Salas, M. y Viñuela, E. (1971). *Virology* 45, 567.
- Meselson, M. y Stahl, F. W. (1958). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43, 581.
- Mindich, L., Bamford, D., Goldthwaite, C., Laverty, M. y MacKenzie, G. (1982). *J. Virol.* 44, 1013.
- Morrow, C. D., Hocko, J., Navab, M. y Dasgupta, A. (1984). *J. Virol.* 50, 515.
- Moss, B. y Cooper, N. (1982). *J. Virol.* 43, 673.
- Nagata, K., Guggenheimer, R. A., Enomoto, T., Lichy, J. H. y Hurwitz, J. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6438.
- Nagata, K., Guggenheimer, R. A. y Hurwitz, J. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4266.
- Nishiyama, Y., Maeno, K. y Yoshida, S. (1983). *Virology* 124, 221.
- Ogawa, T. y Okazaki, T. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* 49, 421.
- Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G. y Steitz, T. A. (1985). *Nature* 313, 762.
- Ortín, J., Viñuela, E., Salas, M. y Vásquez, C. (1971). *Nature New Biol.* 234, 275.
- Pačes, V., Vlček, C., Urbánek, P. y Hostomsky, Z. (1985). *Gene* 38, 45.
- Pačes, V., Vlček, C. y Urbánek, P. (1986a). *Gene* 44, 107.
- Pačes, V., Vlček, C., Urbánek, P. y Hostomsky, Z. (1986b). *Gene* 44, 115.
- Paillard, M., Sederoff, R. R. y Levings III, C. S. (1985). *EMBO J.* 4, 1125.
- Pastrana, R., Lázaro, J. M., Blanco, L., García, J. A., Méndez, E. y Salas, M. (1985). *Nucl. Acids Res.* 13, 3083.
- Peñalva, M. A. y Salas, M. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5222.
- Pincus, S., Robertson, W. y Rekosh, D. (1981). *Nucl. Acids Res.* 9, 4919.
- Plasterk, R. H. A., Simon, M. I. y Barbour, A. G. (1985). *Nature* 318, 257.
- Prieto, I., Lázaro, J. M., García, J. A., Hermoso, J. M. y Salas, M. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1639.

- Prieto, I., Serrano, M., Lázaro, J. M., Salas, M. y Hermoso, J. M. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 314.
- Pruijn, G. J. M., van Driel, W. y van der Vliet, P. C. (1986). *Nature* 322, 656.
- Pruijn, G. J. M., van Driel, W., van Miltenburg, R. T y van der Vliet, P. C. (1987). *EMBO J.* 16, 3771.
- Reha-Krantz, L. J. (1988). *J. Mol. Biol.*, en prensa.
- Rekosh, D. M. K., Russell, W. y Bellett, A. J. D. (1977). *Cell* 11, 283.
- Richardson, C. C., Beauchamp, B. B., Huber, H. E., Ikeda, R. A., Myers, J. A., Nakai, H., Rabkin, S. D., Tabor, S. y White, J. (1987). *DNA Replication and Recombination*. Alan R. Liss, New York, 47, 151.
- Robinson, A. J., Youngusband, A. B. y Bellett, A. J. D. (1973). *Virology* 56, 54.
- Roth, A. C., Nossal, N. G. y Englund, P. T. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 1267.
- Rouvière-Yaniv, J. y Gross, F. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3428.
- Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M. y Germond, G. E. (1979). *Cell* 17, 265.
- Saedi, M. S., Garvey, K. J. e Ito, J. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 955.
- Salas, M., Mellado, R. P., Viñuela, E. y Sogo, J. M. (1978). *J. Mol. Biol.* 119, 269.
- Salas, M. (1988). *Current Topics Microbiol. Immunol.*, 136, 71.
- Savilahti, H. y Bamford, D. H. (1986). *Gene* 49, 199.
- Savilahti, H. y Bamford, D. H. (1987). *Gene* 57, 121.
- Shekman, R., Wickner, W., Westergaard, O., Brutlag, D., Geider, K., Bertsch, L. L. y Kornberg, A. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2691.
- Shih, M. F., Watabe, K. e Ito, J. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 1031.
- Shih, M. F., Watabe, K., Yoshikawa, H. e Ito, J. (1984). *Virology* 133, 56.
- Sogo, J. M., García, J. A., Peñalva, M. A. y Salas, M. (1982). *Virology* 116, 1.
- Sridha, P. y Condit, R. C. (1983). *Virology* 128, 444.
- Stam, J. C., Kwakman, J., Meijer, M. y Stuitzé, A. R. (1986). *Nucl. Acids Res.* 14, 6871.
- Stark, M. J. R., Mileham, A. J., Romanos, M. A. y Boyd, A. (1984). *Nucl. Acids Res.* 12, 6011.
- Stillman, B. W., Tamanoi, F. y Mathews, M. B. (1982). *Cell* 31, 613.
- Tabor, S., Huber, H. E. y Richardson, C. C. (1987). *J. Biol. Chem.* 622, 16212.
- Talavera, A., Salas, M. y Viñuela, E. (1972). *Eur. J. Biochem.* 31, 367.
- Tamanoi, F. y Stillman, B. W. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2221.

- Tamanoi, F. y Stillman, B. W. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6446.
- Tolun, A., Aleström, P. y Pettersson, U. (1979). *Cell* 17, 705.
- Tomizawa, J. y Selzer, G. (1979). *Ann. Rev. Biochem.* 48, 999.
- Tsurumi, T., Maeno, K. y Nishiyama, Y. (1987). *Gene* 52, 129.
- Tullins, T. y Dombroski, B. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5469.
- Turpen, T., Garger, S. J., Marks, M. D. y Grill, L. K. (1987). *Mol. Gen. Genet.* 209, 227.
- Van Bergen, B. M. G., van der Ley, P. A., Van Driel, W., van Mansfeld, A. D. M. y van der Vliet, P. C. (1983). *Nucl. Acids Res.* 11, 1975.
- Vartapetian, A. B., Koonin, E. V., Agoi, V. I. y Bogdanov, A. A. (1984). *EMBO J.* 3, 2593.
- Villanueva, N. y Salas, M. (1981). *J. Virol.* 38, 15.
- Viček, C. y Pačes, V. (1986). *Gene* 46, 215.
- Watabe, K., Shih, M. F., Sugino, A. e Ito, J. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5245.
- Watabe, K., Leusch, M. e Ito, J. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5374.
- Watson, J. D. y Crick, F. H. C. (1953). *Nature* 171, 734.
- Watson, J. D. (1972). *Nature* 239, 197.
- Wechsler, J. A. y Gross, J. (1971). *Mol. Gen. Genet.* 113, 273.
- Weitz, M., Barondy, B. M., Maloy, W. L., Ticehurst, J. R. y Purcell, R. H. (1986). *J. Virol.* 60, 124.
- Whiteley, H. R., Ramey, W. D., Spiegelman, G. B. y Holder, R. E. (1986). *Virology* 155, 392.
- Wickner, W., Brutlag, D., Shekman, R. y Kornberg, A. (1972). *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 965.
- Wu, H. y Crothers, D. (1984). *Nature* 308, 509.
- Yanofsky, S., Kawamura, F. e Ito, J. (1976). *Nature* 259, 60.
- Yehle, C. O. (1978). *J. Virol.* 27, 776.
- Yoshikawa, H., Friedmann, T. e Ito, J. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1336.
- Yoshikawa, H. e Ito, J. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2596.
- Yoshikawa, H. e Ito, J. (1982). *Gene* 17, 323.
- Yoshikawa, H., Garvey, K. J. e Ito, J. (1985). *Gene* 37, 125.
- Zaballos, A., Salas, M. y Mellado, R. P. (1986). *Gene* 43, 103.
- Zaballos, A., Mellado, R. P. y Salas, M. (1988). *Gene*, 63, 113.

DISCURSO DE CONTESTACION
POR EL PRESIDENTE DE LA ACADEMIA
EXCMO. SR. D. ANGEL MARTÍN-MUNICIO

Excelentísimos Señores Académicos,
Señoras y señores.

Es tradición bien conocida que la representación de la Real Academia –la que yo ostento ahora– responda en nombre de ella al discurso de ingreso de su nuevo miembro. Y es hábito general que la contestación glose, con mayor o menor interés o agudeza, los méritos y señale el acierto, pues, de la figura elegida.

Nada más fácil, si no estuviéramos convencidos de ello, que hacerles llegar a ustedes, y a todo nuestro entorno social, esa sensación de acierto y de satisfacción que yo quiero anticiparles. Fácil del todo porque la profesora Salas es una personalidad singular uncida a la presente historia de la ciencia española. Personalidad que acude a la Academia, y refrenda su acierto, con lo que de enriquecedora tiene todavía la juventud y ya con la esencialidad propia de la madurez. Personalidad granada en los entresijos de nuestra reciente evolución intelectual; madurada a la par que el progreso formidable de la moderna Biología; fiel a los principios de la excelencia y de la calidad, imprescindibles al desarrollo de las elites del saber y al ejercicio de su poder social, pero atenta siempre, también, y no es superfluo, a compartirlos con los genuinos sentimientos de la fortaleza, la sencillez, la cortesía e, incluso, –como Ortega señalara– con la *fina cultura del gesto*. Valores todos con los que nuestra aca-

démica se ha movido permanentemente a través de su extensa obra científica, dentro y fuera de España.

Yo quisiera atenerme en estas palabras de contestación y bienvenida, en la forma y en la tradición; de saludo y afecto en el sentimiento personal; a la exhibición del trabajo de la doctora Salas en el ambiente socio-científico de la época y de sus años mismos. Me parece que este entramado histórico, de tremenda cortedad en el tiempo a la vez que inigualmente intenso en el desarrollo de las ideas científicas, es relevante a la elección académica que cumple en este acto una brillante ceremonia social, engrazada en la misma razón de ser de la Real Academia.

Y es que las Academias y su poder social, al igual que los pueblos y las instituciones, serán lo que resulte del poder propio y el efectivo valer de sus miembros, es cierto, pero también lo que trascienda del efecto cooperativo que su corta masa sea capaz de lograr. Cuestión que si nunca fue ociosa, menos lo es ahora en que las Academias, y esta Real de Ciencias a la cabeza, tantean su mejor acomodo a las exigencias y a las condiciones científicas y sociales de nuestro tiempo. Nada nuevo tampoco; siempre hubieron de hacerlo a lo largo de su historia y de aquí que esta avenencia actual sea parte de la misma tradición académica.

No intento descubrir nada al asegurar que las Academias, su contenido y su razón, han ido cambiando a través de los siglos: círculos intelectuales; centros de debate, de intercambio de resultados y de descripción de experimentos en los que la inquietud cultural se mezcló con la incipiente ciencia moderna; refugios de la historia del conocimiento; instrumentos de cooperación entre sociedades y de relaciones institucionales; factores de prestigio nacional e instrumentos del estado moderno. Con estos argumentos, en todo o en parte, las Academias se afirmaron cada vez, pero a condición de conservar el ambiente intelectual que difuminó el dogmatismo y dió cobijo al pensamiento crítico y al espíritu original; se afianzaron siempre, pero en la seguridad de que la transformación contemporánea de la humanidad se debe y se caracteriza por el enorme desarrollo del conocimiento al que todas las instituciones, incluso las más tradicionales, han de acomodarse. Y es que, a no dudarlo, la única y más elegante manera de conservar la debida e insustituible tradición académica es incorporarse a las corrientes científicas y sociales que hacen huella en nuestros días. Tradición y modernidad han de conjugarse en el camino hacia las metas, no por cambiantes menos conocidas, cuyo lo-

gro, como misión colectiva de esta Casa, se verá mejor cumplida a partir de estos momentos. Es indudable que el espacio social y científico de esta Real Academia se ve hoy expandido e intensificado con su nuevo miembro.

No es insustancial a esta cuestión que cuando nace nuestra académica –entonces sólo Margarita y, hasta hoy, Margarita a secas para un ancho censo de adeptos– se vivía aún en la oscura antigüedad de ese microcosmos molecular que iba a ser, transcurridos muy pocos años, tan sólo un cuarto de siglo, el objeto preferente de su actividad investigadora: el ácido desoxirribonucleico. El caso es que durante toda la década de los años 30, se conocía, al después noble DNA, como plebeyo ácido nucleico del timo, cuya existencia era sabida con anterioridad, durante más de medio siglo. Durante estos años de penumbra, la distribución, el origen, la composición, no digamos la nomenclatura, de estos constituyentes celulares fue confusa y cambiante; y a la doctrina del tetranucleótido estadístico era a lo más que, dentro de una enorme lógica química, se podía llegar en el orden estructural.

Y al igual que en los tiempos de la historia de la humanidad hay mojoneros con los que habitualmente se deslindan las edades o aparecen circunstancias singulares que sirven para hacer a ciertas épocas renacer, ilustrar o ser de oro, también en la historia de la ciencia hay señales, hay paradigmas, que dividen períodos y alumbran eras. Y en esa oscura antigüedad refulgió una *edad de oro* del DNA; dura poco más de una docena de años y su exhalación se atempera por aquellos en que Margarita Salas concluye su licenciatura en Ciencias Químicas. Era brillante que se inicia, de forma neta, en 1944, al ponerse de manifiesto esa nobleza del DNA con el descubrimiento de toda su responsabilidad como substancia genética en los experimentos de transformación de unas cepas celulares en otras diferentes.

A pesar de ello, prosigue por estas fechas el desconocimiento preciso de su función; es creencia general que ambos tipos de ácidos nucleicos se sintetizan simultánea e independientemente y no deja de ser curiosa la sugerencia, entonces, de la obtención de DNA a partir de RNA; ejemplo de como, algunas veces, las verdades se aciertan más que se elaboran y, desde luego, en este caso la conjetura se hizo a través de conceptos que no podían dar de sí lo suficiente como para evidenciar lo que al cabo de algunos años habría de ser la bella herejía de la transcripción in-

versa.

Fueron aquellos unos años de lucha y competencia por el linaje molecular; proteínas y ácidos nucleicos pugnan como portadores heráldicos de la información debida para la compleja funcionalidad biológica. Por si quedaba alguna duda, en 1952 se demuestra que cuando una bacteria es infectada por un bacteriófago, en particular *Escherichia coli* por el fago T2, tan sólo el DNA viral penetra la célula huésped y en su seno es capaz de producir muchas copias idénticas del virus infectante. Quedó claro que el DNA portaba toda la información para su autorreproducción completa y, obviamente, de sus ingredientes. De esta manera, se utilizó por primera vez la infección de una célula por un virus como modelo experimental de la función del DNA; sistema modelo que en el caso particular del bacteriófago Φ 29 ha venido empleando la doctora Salas en sus investigaciones de los últimos veinte años.

Al año siguiente, en 1953, en la cúspide dogmática de la Biología Molecular, haciendo uso del en boga reduccionismo ideológico y técnico de la física a la biología, se descubre y se atestigua la estructura doble helicoidal del DNA, basada en el apareamiento de las bases nitrogenadas que los esqueletos de cada fibra enfrentan entre sí. Posiblemente, no ha habido en la historia de la Ciencia un reconocimiento estructural tan extraordinariamente rico en intuiciones, tan sugeridor de funciones y tan repleto de realidades como el de este famoso rizo bicatenario contenido en los genes y en los cromosomas. A la nobleza de su herencia se une la aristocracia del trabajo que realiza.

No tiene nada de extraño, pues, que las medidas y las proporciones de esta molécula, referida clásicamente como la doble hélice, goce de las razones estéticas y matemáticas conocidas como la *razón de oro*; simbolizada por el número irracional Φ , en honor del famoso escultor griego Fidias, quien utilizó con frecuencia esta relación de oro en las dimensiones arquitectónicas de la época y a la que obedece la estructura del Partenon ateniense y usaron también Leonardo y el arte renacentista.

Resultó, pues, que la estructura de esta molécula fundamental era capaz de sustentar dos funciones discretas principales: la perpetuación del genotipo a través de su propia *replicación*, por la que en un cromosoma se convierte en dos cromosomas idénticos; y la *transferencia de la información*, camino de su manifestación fenotípica en las moléculas de las

proteínas. Dos funciones aristócratas a las que corresponden dos conceptos y dos vocablos: *replicación* y *expresión*. Durante un cuarto de siglo, exactamente, ambos conceptos han sido el objeto de la pulcritud y la excelencia investigadoras de Margarita Salas, a los que se incorpora muy pocos años después –tres o cuatro– de esta culminación sobresaliente y paradigmática con que concluía la década de los 50. Quiere ello decir que a partir de 1960 hubo de comenzar otra corta era, apenas una docena de años, en la que se consolidan las alturas conseguidas en las cordadas anteriores; era sin descubrimientos deslumbrantes pero extraordinariamente fructífera e imprescindible en la averiguación de nuevas propiedades metabólicas y estructurales del DNA. Las moléculas de DNA se sintetizan y degradan, se modifican y se fraccionan, se analizan en sus crecientes niveles estructurales, se replican y transcriben, se lesionan y se reparan, se ensamblan y se superenrollan. Incluso, su presencia se extiende a otras localizaciones diferentes del núcleo celular; mitocondrias y cloroplastos habían de manifestarse ricos asimismo en DNA.

Una de las obras especializadas más clásicas sobre DNA dice a colación de esta época que *Genética y DNA se convierten en una rama de la Química*. Los tratamientos de la Química: los mecanismos hidrolíticos químicos y enzimáticos; las titulaciones electrométricas y la naturaleza de las disociaciones; la determinación de los tamaños moleculares; el estudio de propiedades como desnaturalización, densidad, sedimentación, viscosidad y refringencia; el conocimiento de las fuerzas de enlace; tipos de estudios, todos ellos, que imprimían un estilo e imponían unas necesidades conceptuales y tecnológicas al alcance preferente de los expertos de la química.

Todos estos fenómenos, mecanismos y detalles se agolpan en los estudios de esta docena de años y a ellos contribuyen la recién doctora en Ciencias Químicas, Margarita Salas, en su trabajo posdoctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Nueva York. Durante este período, mediada la década de los 60, la punta de lanza de los estudios sobre los mecanismos de la expresión génica era la traducción, en sus principios y momentos iniciales, de la secuencia nucleotídica mensajera en el potencial informativo propio de la estructura primaria de las proteínas. Así, en pleno vórtice de este torbellino científico, la doctora Salas desarrolló un sistema *in vitro* de síntesis de proteínas, libre de nucleasas. Utilizando este sistema y polinucleótidos sintéticos con tripletes es-

pecíficos en los extremos 5' o 3', determinó la dirección, 5' a 3', de la lectura del RNA mensajero. Posteriormente, aisló de los ribosomas de *Escherichia coli* dos proteínas necesarias para la iniciación de la traducción, en la formación del complejo de iniciación entre formilmetionil-tRNA y la subunidad ribosómica 30S, en presencia del triplete de iniciación AUG.

A su regreso a España, en 1967, se incorpora al Departamento de Genética Molecular del Instituto de Virología y Genética Molecular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y, diez años después, en 1977, al recién creado Centro de Biología Molecular. La funcionalidad del DNA continúa siendo su objetivo primario de investigación. Si la etapa posdoctoral se detuvo en la expresión del DNA y, particularmente, en el complejo mecanismo del comienzo de la traducción; ahora, como responsable inmediata y directa de la investigación estudia también la expresión del DNA y su control, pero como fenómeno subyacente a la morfogénesis del bacteriófago $\Phi 29$ como sistema modelo. Mediante el uso de mutantes letales condicionales del fago, aislados en el laboratorio, determinó los pasos necesarios para el ensamblaje de la partícula viral, demostrando la existencia de proteínas morfogenéticas, que intervienen en la formación del virus pero no contribuyen, después, a la propia estructura viral. Descubrió, asimismo, la existencia de una proteína unida al propio DNA del fago, que da lugar a la formación de moléculas circulares de DNA y que, posteriormente, demostró que se trataba de una proteína unida covalentemente a los extremos 5' –la llamada *proteína terminal*– y que interviene en la iniciación de la replicación.

Es así como, al lado de la expresión del DNA, inició nuestra académica, durante los diez últimos años, el estudio del otro fenómeno con el que esta molécula comparte su dualidad esencial: la *replicación*. Y todo lo que ustedes acaban de escuchar se ha referido a una modalidad de *duplicación*, perteneciente a ese lenguaje a la vez mítico e inconsciente; lenguaje anterior aún al que fue fruto del pensamiento organizado del hombre; lenguaje, por tanto, que no intenta abarcar ni buscar palabras que reflejen el concepto de la cosa; lenguaje que, indiferente ante los sonidos, por muy bellos que éstos sean, explica los fenómenos con los niveles de información residentes en la estructura química y en las propiedades de las moléculas; lenguaje, no por inconsciente menos real, que, en su complejidad estructuralista superior, se funda en el reconocimiento y la comunicación. Esta ha sido –*reconocimiento, comunicación* y

lenguaje— la carga de significado del original mecanismo de replicación del DNA mediante proteína terminal; una manera original por la que las moléculas interpretan y construyen para hacer visible el inconsciente. Esto es lo que hemos escuchado, pero me importa tanto, quizá más, subrayar ahora que ello ha sido fruto de la originalidad investigadora de Margarita Salas. Quizá, también, sea bueno en este momento proclamar que en esta originalidad y en la excelencia como cualidad reside todo prestigio científico. El gran sociólogo de la ciencia moderna, Robert K. Merton, ha escrito a este propósito: *...la originalidad es un importante objetivo institucional de la ciencia moderna, a veces el principal, y el reconocimiento de la originalidad un objetivo derivado, pero a menudo de igual importancia. En la competencia organizada para contribuir al conocimiento científico humano, la victoria es para el más veloz, para el que llega primero con su contribución en la mano.*

Hoy, la institucionalización de la ciencia moderna ha traído consigo una fácil objetivación de la originalidad y la excelencia; la misma que ha poseído de antiguo cualquier obra de creación: el patrón universalista; universalismo sin restricciones al que hacía referencia Pasteur cuando clamaba: *Le savant a une patrie, la science n'en a pas*. La ciencia, en efecto, no la tiene y, por ello, toda esta labor que retazo lleva la firma de Margarita Salas en varios centenares de publicaciones y comunicaciones internacionales que son el mejor —me atrevería a decir el único— reconocimiento honorífico, la recompensa simbólica del interés y la capacidad intelectual y, a la vez, el indicador externo del desempeño de la excelencia.

Originalidad y universalismo como valores de referencia, ciertamente, pero sin caer en el riesgo de su unicidad. A esta idea se retraía Merton cuando aseguraba: *Si la institución de la ciencia asignase gran valor solamente a la originalidad, quizá los científicos atribuirían una importancia aún mayor al reconocimiento de la prioridad de la que ya le atribuyen. Pero, por supuesto, ese valor no es el único. Sólo es uno de un complejo conjunto que constituye el ethos de la ciencia; el desinterés, el universalismo, el escepticismo organizado, el comunismo de la propiedad intelectual y la humildad son algunos de los otros valores. Entre éstos, el valor socialmente impuesto de la humildad tiene la importancia más inmediata, ya que sirve para reducir la mala conducta de los científicos a un nivel inferior al que tendría si sólo se asignase importancia a la originalidad y al establecimiento de prioridades.* Entre los diver-

sos fenotipos –permítaseme la comparación– que la expresión de la humildad puede alcanzar, quiero traer a cuento dos referencias pertinentes. A uno de sus críticos Newton escribió: *Si he visto más de lejos, ha sido encarándome sobre los hombros de gigantes*. Y Darwin admiró en Lyell *la minuciosa honestidad con que citáis las palabras de todos los geólogos vivos y muertos*. No me duelen prendas en asegurar que la profesora Salas ha cumplido durante veinte años su docencia de la Genética Molecular ejerciendo estos valores, a la vez que contribuyendo a definir la filiación histórica de las ideas de este naciente campo intelectual y a contrastar esta rama de la ciencia y de su método científico con el pensamiento social.

No olvidemos que estos rasgos de la personalidad científica y humana de la doctora Salas han salido, uno tras otro, como las cerezas del cesto de la investigación original que ha guiado el desarrollo de su discurso académico. Pudiera parecer redundante, y efectivamente lo es, eso de la investigación original; pero no estará de más que redundemos cuando ello sirva para espigar el fruto genuino de la autenticidad creadora, separado de la maleza conforme a la advertencia bíblica e, incluso, a la sabiduría castiza de nuestros comerciantes de antaño cuando avisaban *desconfíe de las imitaciones*. Pues bien, con la validez de la redundancia para testimoniar el atributo de la creatividad, intrínseco a la investigación, puedo dar fe del prestigio internacional con él alcanzado. Esfuerzo y prestigio jalonados por numerosas distinciones académicas, entre las que quisiera destacar su elección en 1980 como miembro de la Organización Europea de Biología Molecular, de cuyo Consejo Directivo forma parte desde 1983; ha sido asimismo organizadora de simposios y profesora visitante de dicha Organización. No en balde, el tema que hemos escuchado, sobre *replicación del DNA*, configura en la actualidad uno de los campos más complejos de la Biología Molecular y Celular incluso de la Biología teórica; complejidad y amplitud tributarias de la misma versatilidad estructural de la molécula.

Ocurre que las funciones biológicas de los ácidos nucleicos, del DNA en particular, dependen de sus conformaciones e incluso de las variaciones locales de estructura, conducentes a una considerable microheterogeneidad. Efectivamente, el superenrollamiento puede conducir a cambios topológicos en la conformación global y, en determinadas secuencias, a estructuras cruciformes, demostrables por métodos electroforéticos, enzimáticos, inmunológicos y espectroscópicos; mediante sondas

químicas –enzimas de restricción, entrecruzamiento por psoraleno, etc.- o por microscopía electrónica. Hoy no existe duda alguna de que las conformaciones poco frecuentes del DNA –DNA siniestro, estructuras cruciformes o DNA anisomórfico–, estabilizadas bajo ciertas condiciones –circunstancias iónicas, 5-metilación de la citosina, unión de ligandos y, por supuesto, el enrollamiento– cumplen importantes funciones biológicas. En los últimos años están recibiendo gran interés las secuencias alternadas purina-pirimidina, en virtud de su adopción de la conformación siniestra Z, favorecidas en las moléculas de DNA superenrolladas por las mismas razones topológicas que las estructuras cruciformes. La mencionada microheterogeneidad local puede, incluso, fluctuar y, en su globalidad, las fluctuaciones estructurales de la doble hélice, asociadas a la fusión local de los enlaces de hidrógeno entre pares de bases, originan la llamada respiración del DNA. Fenómenos todos capaces de afectar al control no sólo de la replicación y de sus complejos iniciales, sino de la transcripción, de las mutaciones y de los procesos de recombinación. En este sentido, y aunque supuesto, queda aún por clarificar el efecto de la topología del DNA y de la tensión torsional sobre la expresión génica de los organismos eucarióticos.

A su vez, estas alternativas estructurales, más o menos estables, con parámetros físicos diferentes, con potenciales distintos de reconocimiento e interacción, han de ofrecer modulaciones conformacionales capaces de desencadenar respuestas variables y operaciones y reglas generativas que incluyen metabolismo y su regulación, desarrollo y diferenciación, ensamblamiento y morfología, cuyos estados finales vienen condicionados por los mecanismos operativos. Todo esto quiere decir que de la misma manera que la gramática genera las oraciones de una lengua y admite, para cada una de ellas, un conjunto de representaciones a diferentes niveles lingüísticos; oración y nivel se corresponden con la interacción a escala molecular entre los subsistemas de cuya integración resulta un sistema estructurado, dependiente de la estructura informativa inicial. Resulta de todo punto indudable, pues, que esta equivalencia de conceptos subraya ese dicho y ese hecho de que el ser humano es ante todo un ser de lenguaje; lenguaje con el que se establece una comunicación, con el que se realiza el deseo de encontrarse con otro.

Si la idea de estructura informativa inicial adquiere plenitud funcional y se corresponde con las vicisitudes que experimentan las moléculas de DNA portadoras de información, no hay nada que objetar a que sus es-

estructuras alternativas puedan iniciar su actitud diferencial a través de su distinto comportamiento frente a la interacción con las proteínas reveladoras de información. Distinta interacción que va desde la débil unión a través de puentes de hidrógeno a la fuerte que la covalencia supone. En la primera de las situaciones extremas, la interacción proteínas-DNA ha dado lugar a estudios relativos tanto a la secuencia de la región del DNA implicada, como a la naturaleza de las proteínas; como a las funciones particulares que, además, éstas pueden cumplir; como a los sistemas en los que se muestra este tipo de participación en el control de la iniciación de la replicación. Es el caso, sobre todo, de la replicación de plásmidos y de virus como el del herpes simple tipo 1. Dentro de la circunstancia de actividades específicas ajenas a la propia interacción, no deja de ser curioso que la proteína que regula la iniciación de la replicación en el plásmido de *Staphylococcus aureus* pT181, posea un comportamiento enzimático propio de endonucleasas y de topoisomerasas; y que la proteína que regula la iniciación de la replicación en el plásmido de *Escherichia coli* pSC101, cumpla, a la vez, misiones represoras de la transcripción de su propio cistron. Sin olvidar que no necesariamente la interacción proteínas-DNA ha de estar vinculada al control de la replicación, otra de las interacciones de mayor significado conceptual y útil es la que conduce a la restricción en sus secuencias palindrómicas del DNA bacteriano, plasmídico o viral cuando se interioriza en una célula huésped. Estas secuencias nucleotídicas palindrómicas constituyen uno de los mensajes informativos más elocuentes; cuando a ellas se liga una proteína, el palíndromo se comunica y, a su manera, con su lenguaje, susurra a su interlocutora: *Soy un mensaje, leeme si posees actividad restrictiva*. Y si el mensaje suena bien, si es reconocido, el DNA se fragmenta y degrada o inserta en los cromosomas de la célula huésped.

En el extremo opuesto, el de la unión covalente de proteínas terminales, encontramos situaciones de genomas virales como en la replicación de adenovirus o, por supuesto, en el caso que acabamos de escuchar del fago $\Phi 29$.

Hemos mencionado hace unos momentos la *actitud diferencial de las estructuras alternativas del DNA*. Estas estructuras —A—, B—, C—, D—, Z—DNA— son capaces de exhibir, en virtud de su sensibilidad molecular característica, distintos ademanes en su interacción con toda una serie de agentes, ya sean por intercalación, o por enlaces de hidrógeno, o por fuerzas de Van der Waals, o por combinación de ellos. No deja de ser no-

torio, tampoco lo es extraño, que entre estos agentes figuren a la vez, carcinógenos y antitumorales. Ambos tipos de sustancias pueden emplearse en una especie de disección de la molécula de DNA que sería resuelta en sus regiones receptoras para, con ello, contruir la imagen de las reglas generales que gobiernan su acción selectiva. La ciencia biológica anda tras la codificación del reconocimiento molecular, de una especie de legislación natural de las actitudes y los comportamientos comunicativos de las moléculas; y en ello son clave –como lo han sido en el desarrollo cultural y social del hombre– los dualismos, las discordancias, las contradicciones y los dilemas; toda afirmación brilla bajo su misma negación; la unidad aparece integrada en los constituyentes del aparente antagonismo.

He intentado colocar la figura humana y científica de nuestra académica, su discurso de ingreso y su marchamo de autenticidad, dentro del marco de la historia y el progreso de la ciencia que ella cultiva y sin que se ocultara el trasfondo de la Institución a la que se incorpora. He pretendido hacerles partícipes, al escuchar a Margarita Salas, de aquel regusto con que Faraday releía las *CONVERSACIONES SOBRE LA QUIMICA* de Janet Marcet, *porque me ha conducido a las verdades y principios de los campos sin límite del conocimiento de las cosas naturales*. Sí estoy seguro del todo, sin embargo, de haber puesto, en esta recepción y bienvenida, la admiración, el afecto y la felicitación con que la Academia siente y desea a la Dra. Salas una dilatada y fecunda estancia.

He dicho.