



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL PLÁSMIDO pBMBt1 DE *Bacillus
thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4 QUE SE
REPLICA POR EL MECANISMO DEL CÍRCULO RODANTE**

TESIS QUE PRESENTA

M. C. PEDRO DAMIÁN LOEZA LARA

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
EN LA OPCIÓN DE
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA**

ASESOR

DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

COASESOR

DR. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN

Morelia, Michoacán, México

Diciembre del 2005

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza y la coasesoría del Dr. Juan José Valdez Alarcón. Para la realización de este trabajo se contó con el financiamiento del CONACYT (proyecto 38746-B) y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (proyecto CIC/14.5).

Esta tesis consta de una parte introductoria al tema de interés, la cual incluye una introducción general y antecedentes del trabajo de investigación. Posteriormente, se describen de manera general algunas de las estrategias metodológicas utilizadas. Asimismo, se muestran los resultados obtenidos que fueron publicados (se anexa el artículo publicado). A continuación, el escrito incluye un apartado que muestra los resultados adicionales que no han sido publicados. El escrito además muestra una discusión general acerca de los resultados (publicados y no publicados) obtenidos y de igual manera una conclusión general del trabajo. Finalmente, se incluyen otras publicaciones relacionadas con el trabajo de tesis.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Los plásmidos bacterianos	1
1.1.1 Organización estructural de los plásmidos	2
1.1.2 Replicación de los plásmidos bacterianos	2
1.2 Diversidad de plásmidos RC	3
1.3 Características generales de los plásmidos RC	4
1.4 Replicación por el mecanismo del círculo rodante (RC)	6
1.5 Proteína Rep iniciadora de la replicación	9
1.6 Origen de replicación de la doble cadena (<i>dso</i>)	10
1.7 Origen de replicación de la cadena sencilla (<i>sso</i>)	11
1.8 Rango de hospederos de los plásmidos RC	14
1.9 Movilización de los plásmidos RC	15
1.10 Los plásmidos RC como herramientas biotecnológicas	16
1.11 <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
1.12 Los plásmidos RC en <i>B. thuringiensis</i>	21
2. ANTECEDENTES	24
2.1 Características de la cepa INTA Mo14-4 de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>darmstadiensis</i>	24
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	25
4.1 OBJETIVO GENERAL	25

4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5.	ESTRATEGIA METODOLÓGICA	26
5.1	Diagrama general de la estrategia metodológica llevada a cabo en este trabajo de investigación	26
5.2	Obtención y purificación del plásmido pBMBt1 de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> INTA Mo14-4	27
5.3	Detección de intermediarios de ADNcs del plásmido pBMBt1 mediante hibridación tipo Southern y digestión diferencial con nucleasa S1	27
5.4	Clonación y determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pBMBt1	27
5.5	Construcción del plásmido pHT <i>mob14-4</i>	29
6.	RESULTADOS	31
	The plasmid pBMBt1 from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> INTA Mo14-4 replicates by the rolling circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene	31
7.	RESULTADOS ADICIONALES	32
	Evaluación de los elementos <i>dso-rep</i> involucrados en la replicación del plásmido pBMBt1 de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> INTA Mo14-4	32
7.1	INTRODUCCIÓN	32
7.2	ESTRATEGIA METODOLÓGICA	33
	7.2.1 Construcción del plásmido pHT3101 Δ ori (vector desarmado para <i>B. thuringiensis</i>)	34
	7.2.2 Construcción de los plásmidos pHT <i>dso-rep</i> y pHT <i>dso</i>	34
7.3	RESULTADOS	36
	7.3.1 Amplificación por PCR de los elementos <i>dso-rep</i> ,	

	<i>dso</i> y obtención de las construcciones pHT <i>dso-rep</i> y pHT <i>dso</i>	36
7.3.2	Obtención de clonas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> 4Q7 transformadas con el plásmido pHT <i>dso-rep</i>	39
8.	DISCUSIÓN	41
9.	CONCLUSIÓN	50
10.	BIBLIOGRAFÍA	51
11.	ANEXOS (publicaciones relacionadas con el trabajo de tesis)	61

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Características de plásmidos RC reportados en diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i>	23

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema general de un plásmido RC	5
Figura 2	Modelo de la replicación de los plásmidos RC mediante un intermediario de ADN de cadena sencilla (ADNcs)	8
Figura 3	Secuencia de nucleótidos y estructura tallo-asa del <i>dso</i> del plásmido RC pT181	11
Figura 4	Estructuras secundarias formadas por los orígenes de la replicación de la cadena sencilla (<i>sso</i>) tipo A y U	13
Figura 5	Secuencia del <i>oriT</i> del plásmido pUIBI-1 de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i>	17
Figura 6	Estrategia de secuenciación del plásmido pBMBt1	28
Figura 7	Estrategia general para la construcción del plásmido pHT <i>mob14-4</i>	30
Figura 8	Estrategia general para la construcción de los plásmidos pHT <i>dso-rep</i> y pHT <i>dso</i>	35
Figura 9	Amplificación por PCR de los elementos <i>dso-rep</i> y <i>dso</i> de pBMBt1 de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> INTA Mo14-4	37
Figura 10	Digestión de ADN de clonas recombinantes que contienen las construcciones pHT <i>dso-rep</i> y pHT <i>dso</i>	38
Figura 11	Amplificación por PCR de los elementos <i>dso-rep</i> y <i>dso</i> de las clonas transformadas de <i>E. coli</i>	38
Figura 12	Obtención de células transformantes de la cepa 4Q7 de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	40
Figura 13	Amplificación por PCR de los elementos <i>dso-rep</i> de transformantes de la cepa 4Q7 de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	40
Figura 14	Modelo teórico que representa la posible	

	adquisición, por recombinación homóloga o ilegítima, del gen <i>cry14-4</i> por parte del plásmido pBMBt1	44
Figura 15	Estructura secundaria formada por el <i>ssoA</i> de pBMBt1	48

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva ampliamente estudiada debido al uso de sus proteínas Cry como bioinsecticidas. Las cepas de *B. thuringiensis* se caracterizan por contener un número variable de plásmidos (1-17) cuyos tamaños varían de 2 hasta 200 kilobases (kb). Los genes que codifican estas proteínas insecticidas se encuentran en plásmidos grandes y conjugativos. La mayoría de los plásmidos pequeños (< 15 kb) estudiados de *B. thuringiensis* se replican por el mecanismo del círculo rodante (plásmidos RC), caracterizado por producir intermediarios de ADN de cadena sencilla (ADNcs). La función que desempeñan estos plásmidos RC en *B. thuringiensis* se desconoce; adicionalmente, el número de vectores de clonación para la transferencia de genes a *B. thuringiensis* es limitado. Debido a esto, el objetivo del presente trabajo fue la caracterización de los elementos genéticos del plásmido pBMBt1 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4. Mediante hibridaciones tipo Southern y digestión con nucleasa S1 se detectaron intermediarios de ADNcs provenientes del plásmido pBMBt1, característica distintiva de los plásmidos RC. Posteriormente se obtuvo la secuencia de nucleótidos de pBMBt1. El análisis reveló que pBMBt1 es una molécula circular de 6,700 pares de bases (pb) con un contenido de GC del 32% y se identificaron tres marcos de lectura abiertos (ORFs). La proteína del ORF1 (Cry14-4) mostró identidad con las proteínas CryC53 de *B. thuringiensis* subsp. *cameroun* (24.6%); Cry15Aa de *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* (21.9%) y Mtx2/3 de *B. sphaericus* (27.8%). Este es el primer reporte de la presencia de un gen que codifica una proteína con identidad a proteínas Cry y que se encuentra en un plásmido RC de *B. thuringiensis*. El ORF2 (Mob14-4) codifica la proteína Mob involucrada en la movilización conjugativa de plásmidos pequeños. La proteína Mob14-4 mostró un 74% de identidad con la proteína Mob del plásmido pUIBI-1 de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* y un 64% con la proteína Mob del plásmido pBMY1 de *Bacillus mycoides*. El gen *mob14-4* es funcional, ya que se determinó una frecuencia de transferencia de 9.1×10^6 transconjugantes/célula receptora del plásmido pHT*mob14-4*, que contiene el gen *mob14-4* de pBMBt1. El ORF3 (Rep14-4)

codifica la proteína Rep, involucrada en el inicio de la replicación, ésta posee 64% de identidad con la proteína Rep del plásmido pBMYdx de *B. mycoides*. No se detectó identidad significativa con otras proteínas Rep de plásmidos RC, lo que sugiere que pBMBt1 y pBMYdx constituyen un nuevo grupo de plásmidos RC. Por otra parte, se identificaron los orígenes de la replicación de la doble cadena (*dso*) y de la cadena sencilla (*sso*) en pBMBt1; estos orígenes son característicos de plásmidos RC. El *dso* mostró la más alta identidad (81.4%) con el *dso* del plásmido pUIBI-1 de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*. El *sso* de pBMBt1 es de tipo *ssoA*, ya que mostró la más alta identidad con el *ssoA* de los plásmidos pBMSa1 (41%) y pC194 (40.4%) de *Staphylococcus aureus*. Los elementos *dso-rep* que participan en la replicación de pBMBt1 son funcionales ya que se obtuvieron 1.6×10^4 UFC/ μ g de ADN de la cepa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7 transformada con el plásmido pHT*dso-rep*, que contiene los elementos *dso-rep*.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a Gram positive bacterium widely studied because Cry proteins are used as bioinsecticides. *B. thuringiensis* strains contain a complex pattern of plasmids (1-17) which vary in size from 2 to 200 kilobases (kb). The genes encoding the insecticidal proteins are located on large conjugative plasmids. Most of the small plasmids (< 15 kb) studied in *B. thuringiensis* replicate by the rolling circle mechanism (RC plasmids) in which single stranded DNA intermediates (ssDNA) are produced. The functions of these RC plasmids in *B. thuringiensis* are unknown; additionally the number of cloning vectors for gene transfer in *B. thuringiensis* is limited. The objective of this work was to characterize the genetic elements of plasmid pBMBt1 from *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4. Southern blot and S1 nuclease digestion analysis show that pBMBt1 contains ssDNA intermediates. Subsequently, pBMBt1 was completely sequenced and the analysis of sequence showed that pBMBt1 is a circular molecule of 6700 bases of pairs (bp) with a GC content of 32%, furthermore three open reading frames (ORFs) were identified. The predicted protein of ORF1 (Cry14-4) showed the highest identity with the CryC53 protein from *B. thuringiensis* subsp. *cameroun* (24.6%); Cry15Aa from *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* (21.9%) and Mtx2/3 from *B. sphaericus* (27.8%). This is the first report that shows the presence of a *cry*-like gene (*cry14-4*) in a RC plasmid from *B. thuringiensis*. The ORF2 (Mob14-4) encodes a Mob protein which is involved in the conjugative mobilization of small plasmids. The Mob14-4 protein showed 74% identity with a Mob protein encoded by plasmid pUIBI-1 from *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* and 64% identity with a Mob protein from pBMY1 plasmid from *Bacillus mycoides*. The *mob14-4* gene is functional, as shown by determination of transfer frequencies of 9.1×10^{-6} transconjugants/recipient cell of plasmid pHT*mob14-4*, which contain the *mob14-4* gene from pBMBt1. The ORF3 (Rep14-4) encodes for a Rep initiator protein. This protein showed a 64% identity with Rep protein from plasmid pBMYdx from *B. mycoides*. Rep14-4 did not show identity with others Rep proteins from RC plasmids, this result suggest that pBMBt1 and pBMYdx plasmids represent a new

group of RC plasmids. On the other hand, we identified the origins of replication of the double strand (*dso*) and the single strand (*sso*) in pBMBt1; these origins are characteristic of RC plasmids. The *dso* origin showed the highest identity (81.4%) with *dso* of plasmid pUIBI-1 from *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*. The *sso* origin of pBMBt1 is an *ssoA* type origin, because of showed identity with *ssoA*s origins from pBMSa1 (41%) and pC194 (40.4%) plasmids from *Staphylococcus aureus*. The elements *dso* and *rep*, that are involved in replication of pBMBt1, were functional. We observed 1.6×10^4 CFU/ μ g of DNA of the *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7 strain transformed with the plasmid pHT*dso-rep*, which contains the *dso-rep* elements.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los plásmidos bacterianos

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos presentes en todos los tipos de bacterias estudiadas hasta la fecha. A pesar de que los plásmidos, a diferencia del cromosoma, generalmente no codifican funciones esenciales para el crecimiento de la célula, su presencia tiene influencia en la biología de las bacterias que los contienen ya que juegan un papel significativo en la adaptación y evolución de estos organismos. Por otra parte, los plásmidos han sido moléculas biológicas indispensables en el desarrollo de la biología molecular y en el entendimiento de procesos básicos fundamentales para todos los organismos (Snyder y Champness, 2003).

Estas moléculas han adquirido diferentes secuencias y genes que les han servido para asegurar su replicación y mantenimiento en la célula bacteriana. La adquisición de estas secuencias se refleja en las múltiples características que poseen, por ejemplo, tienen un tamaño variable, existen diferentes mecanismos de replicación y cuentan con un rango de hospederos diferente. Asimismo, otras secuencias y genes les son útiles para aumentar su transferencia entre células bacterianas, mientras que otras le proporcionan a la bacteria alguna ventaja adaptativa bajo ciertas condiciones ambientales. Desde el punto de vista antropocéntrico, algunos fenotipos pueden ser considerados problemáticos, por ejemplo, la expresión de genes que codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos o propiedades de virulencia. Sin embargo, otros fenotipos pueden ser considerados benéficos, tales como las capacidades de fijar nitrógeno atmosférico o bien la presencia de características que puedan ser explotadas en biotecnología, por ejemplo la biorremediación de zonas contaminadas. Las diferentes características, funciones y posibles utilidades de los plásmidos, han estimulado a los investigadores a abordar el estudio de estas moléculas desde el punto de vista básico (conocer su organización estructural, genética y su función) y biotecnológico (su posible utilidad) (Funnel y Phillips, 2004).

1.1.1 Organización estructural de los plásmidos

La estructura de los plásmidos bacterianos varía considerablemente, sin embargo, poseen una región esencial, la cual contiene los genes y otras secuencias involucradas en la replicación y el mantenimiento del plásmido dentro de su hospedero. Estas secuencias incluyen: a) Un origen de replicación (llamado *ori*) característico de cada unidad de replicación y donde inicia el proceso de replicación; b) Aunque no es una característica general, algunos plásmidos codifican para una proteína iniciadora de la replicación, usualmente llamada Rep; y c) Los genes o elementos involucrados en el control de la replicación (Del Solar *et al.*, 1998).

Por otra parte, los plásmidos pueden poseer regiones y genes no esenciales, o dispensables, para el mantenimiento del plásmido en su hospedero. Las funciones codificadas por estos genes representan una ventaja adaptativa. Una amplia variedad de genes con estas características han sido encontrados en diversos plásmidos incluyendo aquellos involucrados en procesos de transferencia y diseminación de plásmidos entre bacterias. Los genes *tra* y *mob*, por ejemplo, son determinantes que participan en la conjugación y movilización, respectivamente, los cuales permiten la transmisión de pequeños plásmidos, denominados movilizables, entre bacterias durante la conjugación (Guzmán y Espinosa, 1997). Además, se han encontrado genes que le confieren al hospedero resistencia a factores externos tales como antibióticos (ej. ampicilina, tetraciclina y kanamicina) o metales pesados; la nodulación de raíces de leguminosas (ej. frijol, alfalfa); genes que codifican proteínas que alteran el metabolismo del hospedero de la bacteria; la producción de péptidos antimicrobianos como las bacteriocinas o genes que codifican proteínas con actividad insecticida, por citar algunos ejemplos (Rasooly y Rasooly, 1997; Snyder y Champness, 2003).

1.1.2 Replicación de los plásmidos bacterianos

Una característica esencial de los plásmidos bacterianos es su habilidad para replicarse como elementos genéticos autónomos, respecto al cromosoma. En

adición a los genes y secuencias considerados indispensables en la replicación de los plásmidos y en su mantenimiento, el hospedero debe contener y proporcionar otras proteínas necesarias para completar el proceso, incluyendo ADN polimerasas, ligasas, primasas y helicasas, por mencionar algunas (Snyder y Champness, 2003).

Hasta ahora se han descrito tres mecanismos principales de replicación de los plásmidos bacterianos: a) La replicación por el mecanismo tipo *theta*, llamado así por la similitud de las estructuras con la letra griega θ , utilizado por plásmidos de diferentes tamaños (desde plásmidos pequeños hasta megaplásmidos); b) La replicación por el mecanismo denominado desplazamiento de la cadena, utilizado por algunos plásmidos de tamaño pequeño y grande; y c) La replicación por el mecanismo asimétrico del círculo rodante (denominado RCR por sus siglas en inglés "Rolling Circle Replication", a cuyos plásmidos representativos nos referiremos como plásmidos RC), el cual es utilizado principalmente por plásmidos pequeños con un tamaño inferior a 15 kb (Loeza-Lara *et al.*, 2004).

Los plásmidos RC de *B. thuringiensis* son el objeto de estudio de este trabajo de investigación, por lo que a continuación se describen de manera detallada sus características moleculares. Para una revisión detallada de los mecanismos *theta* y por desplazamiento de cadena se recomienda revisar Loeza-Lara *et al.* (2004) en la sección de anexos.

1.2 Diversidad de plásmidos RC

Los plásmidos RC fueron descubiertos originalmente en *Staphylococcus aureus* y se han descrito en un gran número de bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* (Devine *et al.*, 1989), *Clostridium butyricum* (Brehm, *et al.*, 1992) y *Brevibacterium lactofermentum* (Fernández-González *et al.*, 1994), entre otras. Se han aislado también en bacterias Gram-negativas tales como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Galli y Leblanc, 1995), *Helicobacter pylori* (King y Dybvig, 1992), *Shigella sonnei* (Yasukawa *et al.*, 1991) y *Pseudomonas putida* (Holtwick *et al.*, 2001). La amplia distribución de plásmidos RC es evidente a partir de

descubrimientos de plásmidos de este tipo en Arqueas (Erauso *et al.*, 1996). Esta diversidad ha permitido proponer un sistema de clasificación basándose en la similitud de las proteínas Rep iniciadoras de la replicación, reconociéndose hasta la fecha la existencia de 17 grupos (http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR/DPR_RCRdata.htm).

1.3 Características generales de los plásmidos RC

Los plásmidos RC son de tamaño relativamente pequeño (1.3 a 15 kb). Poseen una organización estructural compacta y se presentan en un número de copias grande, por ejemplo, el plásmido pT181 de *S. aureus* posee un número de copias de 25. Todos los plásmidos RC descritos hasta la fecha codifican proteínas Rep iniciadoras de la replicación, las cuales tienen actividades de unión específica a secuencias de ADN y actividades de corte y cierre de estas secuencias (Koepsel *et al.*, 1985b). Otra de las características de estos plásmidos es la presencia de dos regiones de ADN que funcionan como orígenes de replicación. Uno de ellos se ha definido como el origen de replicación de la doble cadena, al que nos referiremos como *dso* (del inglés "double strand origin") (Figura 1), el cual es reconocido por la proteína Rep. Interesantemente, en algunos casos el gen estructural que codifica la proteína Rep contiene también la secuencia del *dso*, de tal manera que las proteínas iniciadoras, una vez sintetizadas, pueden unirse a sus propias secuencias codificantes (Gruss y Erhlich, 1989).

El segundo origen de replicación es denominado el origen de replicación de la cadena sencilla, al que denominaremos *sso* (del inglés "single strand origin") (Figura 1). El *sso* es específico del intermediario de ADN de cadena sencilla (ADNcs), característica distintiva de los plásmidos RC, y es importante para la conversión de este intermediario de ADNcs a ADN de doble cadena (ADNdc) (Del Solar *et al.*, 1987).

Con respecto al rango de hospederos de los plásmidos RC, se ha reportado que estos plásmidos se pueden establecer en diferentes hospederos. Por mencionar algunos ejemplos, el plásmido pUB110 es funcional en su hospedero natural *S.*

aureus y en *B. subtilis* (Boe *et al.*, 1989); el plásmido pBAA1 de *B. subtilis* también es funcional en *S. aureus* (Seery y Devine, 1993); el plásmido pMV158 de *Streptococcus agalactiae* se replica también en *B. subtilis*, *S. pneumoniae* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Kramer *et al.*, 1995; Van der Lelie *et al.*, 1989); pTB913 de *Bacillus spp.* se replica en *B. subtilis* y *L. lactis* subsp. *lactis* (Van der Lelie *et al.*, 1989).

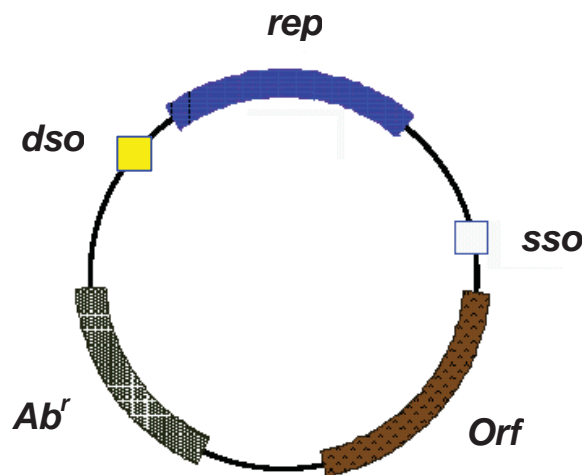


Figura 1. Esquema general de un plásmido RC. *rep*: gen que codifica la proteína Rep iniciadora de la replicación; *dso*: origen de replicación de la doble cadena; *sso*: origen de replicación de la cadena sencilla; Orf: Marco de lectura adicional (ej. proteína de movilización); *Ab'*: determinante de resistencia a antibióticos. Los elementos Orf y *Ab'* no son esenciales para la replicación (Tomado de López-Meza, 2001).

Por otra parte, es común identificar en los plásmidos RC la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos (Figura 1). Por ejemplo, los plásmidos pT181, pC194 y pBMSa1 de *S. aureus* le confieren resistencia a la bacteria contra tetraciclina, cloranfenicol y lincomicina, respectivamente (Khan y Novick, 1983; Loeza-Lara *et al.*, 2004; Novick, 1989). Asimismo, aunque en menor número, se han detectado genes de resistencia a metales pesados (ej. el plásmido pOX6 de *S. aureus* confiere resistencia a cadmio) (Novick, 1989). Algunos plásmidos RC también contienen genes para movilización de ADN, por ejemplo, los plásmidos pTX14-3 y

pUIBI-1 de *B. thuringiensis* poseen el gen *mob* que codifica la proteína Mob involucrada en la movilización conjugativa de pequeños plásmidos (Andrup *et al.*, 2003; López-Meza *et al.*, 2003).

Otros plásmidos RC contienen transposones (ej. pGI2 de *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* contiene el transposón *Tn4430*, el cual codifica para la transposasa TnpA) (Mahillon y Seurinck, 1988). Finalmente, un gran número de plásmidos RC se considera críptico ya que no se les ha atribuido ninguna función para el hospedero, las funciones identificadas en estos plásmidos son exclusivas para el mantenimiento de la molécula en la bacteria. Por ejemplo, el plásmido pHD2 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* posee sólo el gen que codifica la proteína Rep (McDowell y Mann, 1991).

1.4 Replicación por el mecanismo del círculo rodante (RC)

Para que ocurra la replicación de un plásmido RC se requieren tres módulos estructurales: (i) El gen *rep* que codifica la proteína Rep iniciadora de la replicación de la cadena líder y sus elementos regulatorios; (ii) el origen de replicación de la doble cadena, o *dso*, el cual es reconocido por la proteína Rep; y (iii) el origen de la cadena sencilla, o *sso*, reconocido por la ARN polimerasa del hospedero (Andrup *et al.*, 2003; Gruss y Ehrlich, 1989).

El conocimiento actual sobre los eventos moleculares que se llevan a cabo durante el mecanismo de replicación RC proviene principalmente de estudios realizados con los plásmidos pT181 y pC194 de *S. aureus*, y se postula que la mayor parte de estos eventos ocurren en todos los plásmidos RC. Para ejemplificar el modelo de replicación utilizaremos el plásmido pT181 tomando en consideración que podrían existir algunas variaciones en otros plásmidos.

El primer evento durante el inicio de la replicación RC involucra la interacción de un monómero de la proteína Rep (la cual funciona como un dímero) con el *dso*, específicamente en el sitio de unión denominado “bind” (Chang *et al.*, 2000). Se ha demostrado que esta interacción da como resultado la formación de una estructura con forma de horquilla en la región del *dso*, lo cual facilita el corte

realizado por la proteína Rep (Koepsel y Khan, 1986). Posteriormente, Rep mediante una actividad de endonucleasa, elabora un corte o “nick” en una secuencia de nucleótidos específica (TA) sobre una de las cadenas de ADN a través de un residuo de tirosina presente en el mismo monómero de Rep que se unió al *dso*; esta secuencia TA se localiza en el asa de la horquilla (Figuras 2 y 3) (Koepsel *et al.*, 1985a, b; Koepsel *et al.*, 1986). El corte genera los extremos 5' fosfato (5'P) y 3' (3'OH). La proteína Rep se une al grupo 5'P a través del mismo residuo de tirosina que realizó el corte, mediante un enlace fosfotirosina.

Al mismo tiempo que suceden estos eventos, Rep recluta diversas enzimas necesarias para llevar a cabo las etapas subsecuentes del proceso, entre éstas se encuentra la ADN polimerasa III (encargada de realizar la polimerización de la nueva cadena), la ADN helicasa PcrA (en el caso de bacterias Gram-positivas), la cual desenrolla el ADN (Iordanescu, 1993), y las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla o SSB, las cuales protegen la cadena original de ADN que es desplazada. De esta manera se forma un complejo llamado “replisoma”, el cual es necesario para establecer el inicio de la replicación (Del Solar *et al.*, 1998).

La polimerización de la cadena líder se inicia por la extensión del extremo 3'OH libre formado en el sitio de corte, el cual es reconocido por la ADN polimerasa III. La extensión procede hasta que la horquilla de replicación alcanza el sitio de terminación y hasta que el sitio *dso* ha sido regenerado, mientras que la cadena original ha sido completamente desplazada. Para el caso de pT181, la síntesis de ADN procede aproximadamente 10 nucleótidos después del sitio *dso* que ha sido regenerado y que corresponde a un nuevo sitio de corte de Rep. El segundo monómero libre de la proteína Rep realiza un corte en el sitio *dso* regenerado por medio del residuo de tirosina. Luego de una serie de eventos de corte y unión, la cadena original que ha sido desplazada se corta (en su unión con la cadena recién sintetizada) y se liga por medio de la proteína Rep (Rasooly y Novick, 1993; Zhao y Khan, 1997). Posteriormente esta molécula se libera como un monómero de ADNcs junto con una molécula de ADNdc, misma que contiene la cadena recién sintetizada. Esta molécula de ADNdc es ligada y superenrollada por

la ADN ligasa y por la girasa del hospedero, respectivamente. Por otra parte, la proteína Rep se inactiva debido a la unión covalente de la región de ADN de 10 nucleótidos al residuo de tirosina (Figura 2) (Del Solar *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 1988; Khan, 2005; Rasooly y Novick, 1993).

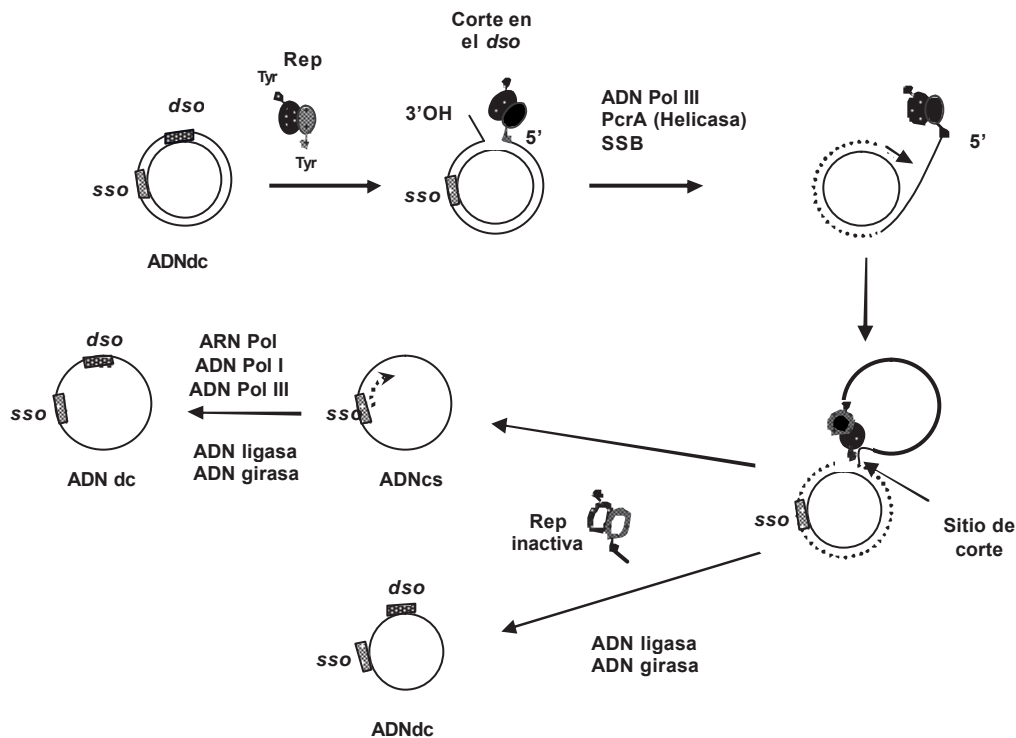


Figura 2. Modelo de la replicación de los plásmidos RC mediante un intermediario de ADN de cadena sencilla (ADNcs). *dso*: origen de replicación de la doble cadena; *sso*: origen de replicación de la cadena sencilla; Rep: proteína iniciadora de la replicación; Tyr: residuo de tirosina; ADNdc: ADN de doble cadena; ADNcs: ADN de cadena sencilla; ADN pol I y III: ADN polimerasa I y III; SSB: proteínas de unión a ADNcs; ARN pol: ARN polimerasa (Modificado de Khan, 2005).

El ADNcs liberado después de que la síntesis se ha completado se convierte a ADNdc, utilizando para ello la región del *sso* y proteínas del hospedero. Esto involucra la síntesis de un oligonucleótido de ARN como iniciador (con una longitud variable de entre 20 y 40 nucleótidos), el cual se extiende por la ARN polimerasa misma que reconoce el sitio *sso*, seguido por la extensión del oligonucleótido por la ADN polimerasa I y subsecuentemente la síntesis por la

ADN polimerasa III. Finalmente, los extremos del ADN se unen por la ADN ligasa y el ADNdc resultante se convierte a la forma superenrollada por la ADN girasa (Figura 2) (Khan, 1997; Kramer *et al.*, 1997).

1.5 Proteína Rep iniciadora de la replicación

La proteína Rep posee diferentes actividades enzimáticas ya que tiene la capacidad de unirse de manera específica al ADN en la región “bind” (sitio de unión de Rep) del *dso*, cortar específicamente en el sitio “nick” (sitio de corte de Rep) del *dso* y establecer un enlace fosfotirosina con el extremo 5'P de una de las cadenas de ADN (Dempsey *et al.*, 1992). Para realizar estas funciones, las proteínas Rep poseen dos regiones importantes: (i) una región no conservada involucrada en la unión específica y no covalente de las proteínas Rep al *dso*; esta unión es considerada un paso crítico para el ensamblaje del complejo de inicio de la replicación (Wang *et al.*, 1992), y (ii) una segunda región (conservado entre las proteínas Rep pertenecientes al mismo grupo) involucrada en el corte y cierre del *dso*. Esta región es considerada el sitio activo de la proteína ya que incluye el residuo de tirosina que participa en el corte que se realiza sobre el *dso* (Dempsey *et al.*, 1992; Iordanescu, 1989).

Es importante mencionar que aún no se conoce la estructura terciaria de las proteínas Rep de plásmidos RC. Sin embargo, se conoce la estructura terciaria del dominio catalítico de la proteína iniciadora de la replicación del virus del enchinamiento del tomate que se replica por el mecanismo RC (Campos-Olivas *et al.*, 2002). Esta proteína comparte diversos motivos conservados con la proteína Rep del plásmido pC194 (Ilyna y Koonin, 1992). Esta información facilitará el entendimiento de las características estructurales y funcionales de las proteínas Rep de plásmidos RC.

Hasta la fecha, se han identificado más de 200 plásmidos RC tanto en bacterias Gram positivas, Gram negativas, como en Arqueas. Las proteínas Rep de algunos plásmidos RC poseen identidad a nivel de secuencia con las de otros plásmidos RC, lo cual ha permitido agrupar esta gran diversidad de plásmidos en

17 grupos con base en la identidad de estas proteínas Rep (http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR/DPR_RCRdata.htm). Cada uno de los 17 grupos posee un plásmido como miembro representativo, por ejemplo, el grupo I, cuyo prototipo es el plásmido pT181 de *S. aureus* (Khan *et al.*, 1988), está formado también por el plásmido pHD2 de *B. thuringiensis* (McDowell y Mann, 1991); por otra parte, el grupo III cuyo prototipo es el plásmido pC194 de *S. aureus* (Te Riele *et al.*, 1986), incluye también al plásmido pUB110 de *S. aureus* (McKenzie *et al.*, 1986). Se han caracterizado otros plásmidos RC cuyas proteínas Rep no muestran identidad con las proteínas Rep reportadas previamente, por lo que se propone que estos plásmidos formarán parte de nuevos grupos (Khan, 2005).

1.6 Origen de replicación de la doble cadena (*dso*)

Los *dsos* son regiones de ADN con un tamaño promedio de 100 pares de bases (pb) (Khan, 1997). Estos contienen dos regiones importantes, una de las cuales posee el sitio de corte de Rep (región “nick”) y la otra está involucrada en la unión de la proteína Rep (región “bind”) (Figura 3A). La secuencia de corte está altamente conservada en los *dsos* de todos los plásmidos pertenecientes a un grupo en particular (la secuencia de corte conservada en los *dsos* de plásmidos pertenecientes al grupo de pT181 es TA), mientras que los sitios de unión de Rep están menos conservados (Del Solar *et al.*, 1993). Se ha observado que los *dsos* de muchos plásmidos RC incluyen repeticiones invertidas que tienen la capacidad de formar estructuras tallo-asa (Figura 3B). Se ha demostrado también que estas características estructurales son importantes para un inicio eficiente de la replicación (Noirot *et al.*, 1990). En algunos grupos de plásmidos RC, los *dsos* se encuentran hacia el extremo 5' de los genes *rep* (Figura 1), mientras que en otros grupos, aquellos se encuentran dentro de las secuencias codificantes de las proteínas iniciadoras (Del Solar *et al.*, 1998; Khan, 1997).

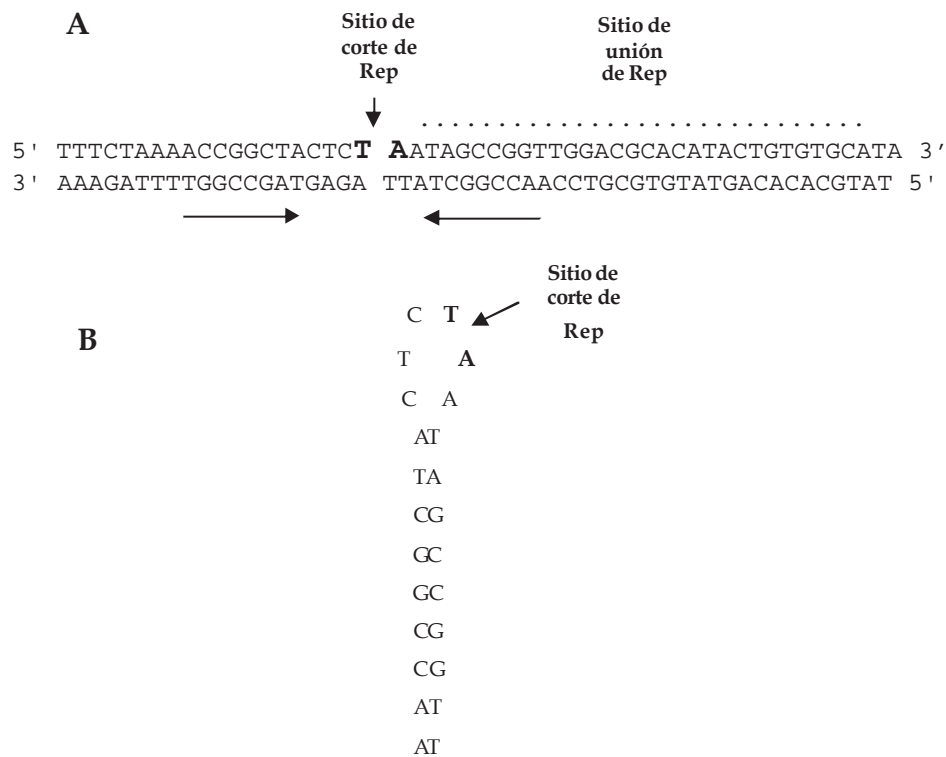


Figura 3. Secuencia de nucleótidos y estructura tallo-asa del *dso* del plásmido RC pT181. A) *dso* del plásmido RC pT181. Se muestran los sitios de corte y unión al *dso* por la proteína Rep. En negritas se muestran los nucleótidos conservados donde se realiza el corte de ADN. Las flechas horizontales (repetidos invertidos) representan los brazos de la estructura secundaria. B) Estructura secundaria tipo tallo-asa formada por el *dso* (Tomado de Khan, 1997).

1.7 Origen de replicación de la cadena sencilla (*sso*)

La cadena parental original, que es desplazada durante la primera etapa de la replicación y que representa el intermediario de ADNcs, es convertida a ADNdc mediante el reconocimiento del *sso*. La secuencia de los *ssos* generalmente puede formar diferentes estructuras secundarias, como se muestra en la figura 4 para los plásmidos pE194 (*ssoA*) y pUB110 (*ssoU*) de *S. aureus* (Gruss *et al.*, 1987). Hasta el momento se han identificado cinco diferentes tipos de *ssos* con base en la similitud estructural o de secuencia, siendo éstos el *ssoA*, presente en el plásmido pT181 de *S. aureus* (Novick, 1989); el *ssoT*, encontrado en plásmidos de *Bacillus* ej. pBAA1 de *B. subtilis* (Jannièrè *et al.*, 1993); el *ssoU*, primero descrito en pUB110 de *S. aureus*

(Boe *et al.*, 1989); el *ssoW*, encontrado en el plásmido pWVO1 de *Lactococcus lactis* (Seegers *et al.*, 1995) y el *ssoL*, identificado en el plásmido p353 de *Lactobacillus pentosus* MD353 (Leer *et al.*, 1992).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que los oligonucleótidos de ARN son sintetizados por la ARN polimerasa del hospedero. La longitud de los oligonucleótidos generalmente está en un rango de 20 a 50 nucleótidos dependiendo del *sso*, en el *ssoA* del plásmido pE194 de *S. aureus* es de 17 a 20 nucleótidos (Figura 4A) (Kramer *et al.*, 1997). En el caso del *ssoU* de pUB110 de *S. aureus*, la longitud de los oligonucleótidos es de 44 a 46 nucleótidos (Figura 4B) (Kramer *et al.*, 1999).

Por otra parte, en los *ssos* se han detectado la presencia de elementos *cis* variables y conservados. Se ha identificado la secuencia conservada RS_B la cual actúa como el sitio de unión para la ARN polimerasa. Esta secuencia se localiza en una región de apareamiento de bases del *ssoA* (región de ADN_{dc}) y contiene secuencias que se parecen a las regiones -10 y -35 típicas de promotores bacterianos (Figura 4). Otra secuencia conservada, CS-6, está localizada en el asa central de la estructura del *ssoA*, y actúa como terminador de la síntesis del oligonucleótido iniciador de ARN (Kramer *et al.*, 1998). Mutaciones en cualquiera de estas regiones reducen severamente la conversión de ADN_{cs} a ADN_{dc}. Interesantemente, las secuencias homólogas a RS_B y CS-6 presentes en el *ssoA*, también están conservadas en los orígenes *ssoU*, *ssoT* y *ssoW* (Kramer *et al.*, 1999).

Por otra parte, los *ssos* están localizados en secuencias no codificantes, son específicos de la cadena líder y, a diferencia de los *dsos*, sus secuencias no están conservadas entre plásmidos que pertenecen al mismo grupo.

Asimismo, los *ssos* son funcionales cuando se encuentran en la forma de ADN_{cs}, de ahí que la replicación de la cadena tardía no inicia sino hasta que la cadena líder ha sido completamente sintetizada. Así, los plásmidos RC se replican por un mecanismo asimétrico y el intermediario de ADN_{cs} representa una característica distintiva de la replicación RC (Gruss y Ehrlich, 1989; Khan, 1997).

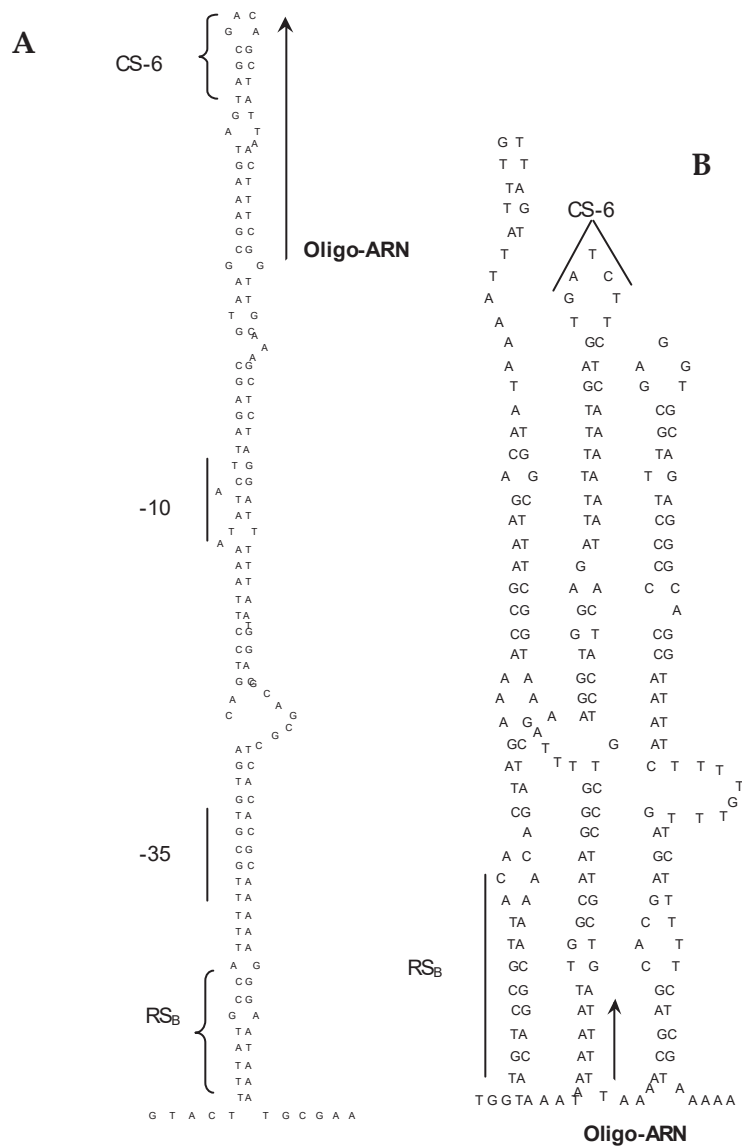


Figura 4. Estructuras secundarias formadas por los orígenes de replicación de la cadena sencilla (*ssO*) tipo A y U. A) *ssOA* del plásmido pE194 de *S. aureus*. B) *ssOU* del plásmido pUB110 de *S. aureus*. Se indican las regiones conservadas -10 y -35, además de los elementos *cis* RS_B y CS-6. Ver detalles en texto (Tomado de Khan, 1997; 2004).

1.8 Rango de hospederos de los plásmidos RC

El rango de hospederos de un plásmido incluye aquellos tipos de bacterias en las cuales un plásmido puede replicarse. Algunos plásmidos se replican en una bacteria y se dice que poseen un rango de hospederos reducido. En contraste, existen plásmidos que se pueden replicar en diferentes bacterias y son denominados de amplio rango de hospederos. La mayoría de los plásmidos RC caracterizados en bacterias Gram positivas se consideran de amplio rango de hospederos (Snyder y Champness, 2003).

La replicación es el principal factor que influye en la capacidad de los plásmidos para mantenerse en diferentes hospederos. Dos estrategias facilitan la replicación de los plásmidos de amplio rango de hospederos: a) el inicio de la replicación independiente de los factores de iniciación del hospedero; y b) la versatilidad en la comunicación entre los factores de iniciación del hospedero y del plásmido (Del Solar *et al.*, 1996).

Los plásmidos RC poseen un módulo que les permite iniciar una replicación independiente de los factores del hospedero. La presencia del gen *rep* (así como sus elementos regulatorios) y el sitio *dso*, son los elementos necesarios para un inicio independiente de la replicación. Sin embargo, y debido a que la replicación de la cadena tardía se lleva a cabo mediante el reconocimiento específico del sitio *sso* por proteínas exclusivas del hospedero, el éxito en la replicación, y por lo tanto el establecimiento del plásmido en su nuevo hospedero, depende del reconocimiento eficiente de los factores de este último y los factores del plásmido, específicamente, el reconocimiento eficiente del *sso* por parte de la ARN polimerasa (Del Solar, *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1998).

Un aspecto interesante sobre el reconocimiento adecuado de los *ssos* por los factores del hospedero, es que algunos de éstos (ej. *ssoA* y *ssoW*) funcionan eficientemente sólo en sus hospederos nativos, mientras que otros (ej. *ssoU*, *ssoT* y *ssoL*) funcionan en diferentes hospederos (Kramer *et al.*, 1995; Pouwels y Leer, 1993). Se ha demostrado que la fuerza de la interacción entre la ARN polimerasa y los *ssos* determina la eficiencia de la síntesis de la cadena tardía en diferentes

hospederos y podría determinar, al menos en parte, el rango de hospederos de los plásmidos RC. De esta manera, la capacidad de los *ssos* para ser reconocidos adecuadamente por los factores de sus hospederos es importante para el rango de hospederos de los plásmidos RC (Kramer *et al.*, 1999; Khan, 2005).

1.9 Movilización de los plásmidos RC

Existen diferentes ejemplos de plásmidos RC que han adquirido diversas estrategias para intercambiar ADN, no sólo para ampliar su rango de hospederos, sino también para intensificar su propagación en las poblaciones bacterianas (Andrup *et al.*, 2003). Dentro de éstas, la conjugación bacteriana es quizás la más difundida; ésta es definida como la transferencia de ADN de una célula bacteriana a otra, mediante las funciones de transferencia codificadas por algún elemento genético, por ejemplo un plásmido denominado conjugativo (también llamado autotransmisible). Los plásmidos conjugativos codifican las funciones necesarias para transferirse de una bacteria a otra. Adicionalmente, estos plásmidos conjugativos también participan en la transferencia de otros elementos genéticos que no pueden transferirse por sí mismos, como el ADN cromosómico o plásmidos denominados movilizables (Snyder y Champness, 2003).

La movilización se define como la transferencia de un plásmido movilizable de una bacteria a otra mediada por un plásmido conjugativo. Los plásmidos movilizables poseen un módulo que les permite ser movilizadas entre bacterias, el cual incluye dos elementos estructurales: (i) el gen *mob*, que codifica para la proteína Mob, involucrada en el inicio de la movilización; y (ii) un elemento *cis*, el *oriT*, el cual es reconocido por la proteína Mob y donde el proceso de movilización inicia por un evento de corte específico sobre el *oriT* (Andrup *et al.*, 2003).

Debido a la importancia que representan los plásmidos movilizables en la transferencia horizontal de genes en la naturaleza, a su impacto en la evolución bacteriana y a su alta variabilidad, Francia y col. (2004) proponen un sistema de clasificación para los plásmidos movilizables en familias y superfamilias de acuerdo a las relaciones de las diferentes proteínas Mob. Por ejemplo, las proteínas

Mob identificadas en plásmidos RC de *B. thuringiensis* se incluyen en la superfamilia del plásmido pMV158 de *S. agalactiae*, que contiene hasta este momento 41 proteínas.

Un alineamiento de las proteínas Mob de la superfamilia de pMV158 (presentes en plásmidos RC y algunos transposones) muestra que éstas poseen tres motivos altamente conservados. El motivo I HxxR (en xx pueden estar presentes diferentes residuos) es un motivo recientemente detectado en las proteínas Mob, del cual se desconoce aún su función. El motivo II [NY(D/E)L], se ha sugerido que representa el sitio catalítico de Mob ya que contiene el residuo de tirosina altamente conservado. Finalmente, el motivo III (HxDE), sobre el cual se postula que podría ser una variante del motivo de histidinas (PHMH) detectado en proteínas de unión a ADN (Francia *et al.*, 2004).

La región del *oriT* está formada por dos secuencias repetidas invertidas (Figura 5A) por lo que ésta tiene la capacidad de formar una estructura secundaria tipo tallo-asa. Se sabe que el sitio de corte se localiza en el asa de la horquilla lo cual facilita el corte realizado por Mob (Figura 5B) (Francia *et al.*, 2004; Guzmán y Espinosa, 1997).

1.10 Los plásmidos RC como herramientas biotecnológicas

Desde principio de los años 70s, los vectores plasmídicos han sido una herramienta importante en los avances de la biología. Los primeros plásmidos ampliamente utilizados incluían a los vectores pSC101, ColE1, pBR322, pUC18/19 y pBluescript, entre otros (Lu, 2004). Actualmente, existe una gran variedad de vectores de clonación disponibles de manera comercial para diferentes bacterias como *E. coli*. Sin embargo, para otras bacterias no existen vectores de clonación disponibles, por lo que se considera necesario el diseño de estas herramientas.

Para diseñar un vector se tienen que tomar en cuenta diferentes criterios como lo son: (i) el tamaño del vector y del inserto, ya que la inserción de fragmentos de ADN mayores de 10 kb tiene un efecto negativo en la estabilidad de algunos vectores; (ii) el número de copias del vector, lo cual es importante ya que

Los plásmidos RC se caracterizan por ser moléculas de tamaño pequeño (< 15 kb), por poseer un alto número de copias, por carecer de grupos de incompatibilidad y por tener un rango de hospederos amplio, por lo que son consideradas moléculas útiles en el diseño de vectores de clonación bifuncionales. Por ejemplo, para la manipulación genética de la bacteria *Corynebacterium glutamicum*, la cual se utiliza para la producción de aminoácidos, se cuenta con los vectores de clonación pBL1, pSR1 y pSCCD1, todos construidos a partir de plásmidos RC nativos de la bacteria (Venkova-Canova *et al.*, 2004). Por otra parte, diferentes vectores tipo theta y RC han sido utilizados para el estudio de bacterias lácticas debido a su importancia en la industria lechera. Los vectores tipo theta se han usado para la clonación de fragmentos grandes de ADN, debido a que muestran mayor estabilidad estructural que los vectores RC, mientras que estos últimos se han utilizado para la clonación de fragmentos más pequeños de ADN. Sin embargo, los vectores RC poseen características que los vectores theta no poseen, por ejemplo, son menos específicos que los vectores theta y pueden ser utilizados como vectores movilizables y compatibles, lo que podría permitir la introducción de diferentes plásmidos en una sola célula y luego ser movilizados a otra cepa de interés. En este sentido, se ha reportado el diseño y uso de tres vectores bifuncionales y de amplio rango de hospederos para *E. coli* y *L. lactis* (p22/25, p720 y pβrec), a partir del plásmido RC pMB02 de *L. lactis* (Sánchez y Mayo, 2004). Estos vectores se establecieron en las bacterias correspondientes sin presión de selección y fueron compatibles con otros vectores ya existentes.

Sin embargo, no todos los plásmidos RC han sido utilizados exitosamente como vectores de clonación, ya que una de las principales desventajas del uso de estos plásmidos como vectores, es su inestabilidad estructural cuando se les insertan fragmentos grandes de ADN foráneo (Mesrati *et al.*, 2005). Este problema puede deberse a las características de los intermediarios de ADNcs producidos por los plásmidos RC, ya que éstos presentan algunas secuencias que estimulan procesos de recombinación homóloga e ilegítima en estos plásmidos cuando son utilizados como vectores (Jannièrè y Ehrlich, 1987).

McDowell y Mann (1991) caracterizaron el plásmido RC pHD2 (~ 2 kb) de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1-DIPEL, el cual fue ligado al vector pBR322 (el cual contiene los genes de resistencia a cloramfenicol y ampicilina) para analizar su capacidad de replicación y su uso como un vector bifuncional. El plásmido generado (pHD2+pBR322) fue introducido en *E. coli*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* y *B. subtilis*. Este plásmido se replicó en *E. coli* y en *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, pero no en *B. subtilis*. Sin embargo, cuando el plásmido (pHD2+pBR322) obtenido de las transformantes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* fue analizado, se observó que éste había perdido un fragmento de ADN, observándose la misma característica en los plásmidos de otras transformantes de *B. thuringiensis*. Este resultado mostró que el plásmido estuvo sujeto a una eliminación de ADN, característica no conveniente en un vector.

1.11 *Bacillus thuringiensis*

La bacteria Gram-positiva *B. thuringiensis* posee como característica distintiva la capacidad de sintetizar y acumular proteínas denominadas Cry y depositarlas como cristales parasporales durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento. Estas proteínas son liberadas después de la lisis de la célula bacteriana y luego de ser activadas por proteasas ejercen una actividad tóxica hacia ciertos grupos de insectos y otros organismos, por ejemplo, larvas de lepidópteros (mariposas y palomillas), dípteros (mosquitos y jejenes), coleópteros (escarabajos) y nemátodos (gusanos), entre otros (Schnepf *et al.*, 1998).

Las proteínas Cry de los cristales parasporales de *B. thuringiensis* son protoxinas que son solubilizadas por el pH alcalino del intestino medio de la larva y luego activadas mediante un procesamiento proteolítico, catalizado por diferentes proteasas de la larva (ej. tripsina). La toxina activa es conocida como δ -endotoxina, la cual se une a receptores específicos presentes en las células del epitelio intestinal del insecto (ej. aminopeptidasas y caderinas) formando poros o canales iónicos en la membrana (Aronson, 2002). Esto provoca una lisis osmótica que conduce a la parálisis y muerte, por inanición, de la larva.

Los cristales parasporales son ampliamente utilizados para la elaboración de bioinsecticidas, lo que ha motivado el estudio y la búsqueda de proteínas Cry. Esto ha permitido establecer la existencia de más de 200 proteínas Cry (http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html). La inclusión de una nueva proteína Cry en este grupo depende del cumplimiento de algunas características, como es su acumulación en la célula mediante un cristal parasporal y el presentar similitud a nivel de secuencia de aminoácidos con alguna de las proteínas Cry existentes; además de contar con actividad tóxica frente a algún organismo (Crickmore, *et al.*, 1998).

Se ha observado que estas proteínas pueden agruparse dentro de distintos grupos de homología. La gran mayoría de estos grupos están formados por proteínas Cry las cuales poseen tres dominios altamente conservados que son importantes en la función de las mismas (De Maagd *et al.*, 2003). El dominio I ha sido implicado en la formación del poro mediante la inserción de sus hélices alfa en la membrana de las células epiteliales. El dominio II juega un papel importante en la interacción con el receptor membranal y es el responsable de la toxicidad específica. Finalmente, el dominio III está involucrado en la unión al receptor y adicionalmente tiene un papel en la formación del poro (De Maagd *et al.*, 2001). Interesantemente algunos miembros de estos grupos también se han encontrado en otras especies bacterianas como *Penibacillus popilliae* (Cry18) (Zhang *et al.*, 1997) y en *Clostridium bif fermentans* (Cry16 y Cry17) (Barloy *et al.*, 1998).

Por otra parte, existen grupos de homología minoritarios formados por proteínas que se depositan como cristales en la bacteria, pero que carecen de los tres dominios conservados de las proteínas Cry. Dentro de éstas, la proteína Cry23 forma parte de un grupo de homología diverso que incluye proteínas Cry de *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* (Cry15Aa) y dos proteínas mosquitocidas (Mtx) de *B. sphaericus* (estas últimas no cristalizan). Adicionalmente, existen proteínas que se depositan como inclusiones cristalinas pero que carecen de actividad tóxica, razón por la cual no se consideran dentro del grupo de proteínas Cry. Entre estas

tenemos a las proteínas CryC53 y CryC35 de *B. thuringiensis* subsp. *cameroun* (De Maagd *et al.*, 2003).

La mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* exhiben usualmente un perfil complejo de plásmidos (cuyos tamaños varían desde 2 hasta > 250 kb), muchos de los cuales son conjugativos. Los genes *cry* que codifican las toxinas Cry insecticidas se encuentran ubicados en estos grandes plásmidos conjugativos, generalmente con un tamaño superior a 30 kb. Adicionalmente, no se ha reportado la presencia de genes *cry* en plásmidos pequeños (\leq 15 kb). Los genes *cry* generalmente se encuentran asociados a secuencias de inserción y transposones. Esta característica provee un medio importante para la movilización de toxinas y para el ensamblaje de nuevas combinaciones de genes *cry* en cepas de *B. thuringiensis* (Aronson, 2002; Schnepf *et al.*, 1998).

1.12 Los plásmidos RC en *B. thuringiensis*

Como se ha señalado, *B. thuringiensis* es una bacteria con un perfil complejo de plásmidos y con proteínas Cry codificadas por los genes *cry* localizados en plásmidos conjugativos mayores a 30 kb y con replicación tipo theta. A partir de estas características surgen varias interrogantes que tienen que ver con la biología de la bacteria: ¿Cuál es el papel que tienen los plásmidos menores a 15 kb en *B. thuringiensis*?, ya que estos plásmidos se encuentran frecuentemente en las cepas de *B. thuringiensis*. Asimismo, ¿Cuál es la función biológica que tienen los plásmidos RC en *B. thuringiensis*?. En otras bacterias, por ejemplo *S. aureus*, es común encontrar genes de resistencia a antimicrobianos (antibióticos y detergentes) y metales, por lo que se habla de una función de estos plásmidos para la bacteria (Khan, 1997; Loeza-Lara *et al.*, 2004).

Hasta este momento se ha determinado la secuencia de diez plásmidos RC menores a 15 kb en *B. thuringiensis*. Estos plásmidos han sido considerados como “crípticos” debido a que no se les ha atribuido ninguna función para la bacteria, solamente se han encontrado funciones relacionadas con la replicación y movilización de ADN (Cuadro 1). La reducida información que existe sobre los

plásmidos RC en *B. thuringiensis* contrasta con la extensa información que existe sobre los genes *cry* y las proteínas Cry.

Por otra parte, la creciente aceptación de los productos de *B. thuringiensis* como bioinsecticidas, ha incrementado la demanda en el diseño y uso de plásmidos como vectores de clonación utilizados para la transferencia de genes y el mejoramiento de cepas de *B. thuringiensis* (Mesrati *et al.*, 2005). En este sentido, el número de vectores con los que se cuenta para estudiar a esta bacteria es aún reducido y el acceso a los vectores existentes es limitado, por lo que se considera necesario incrementar este tipo de herramientas biotecnológicas. Una característica importante de los plásmidos RC de *B. thuringiensis* es que podrían ser utilizados como base en el diseño de vectores de clonación para esta bacteria; además podrían ser evaluados como vectores de clonación para otros sistemas microbianos, por ejemplo, el estudio de las bacterias Gram positivas del rumen del ganado.

Cuadro 1. Características de plásmidos RC reportados en diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Plásmido	Hospedero natural	Tamaño (kilobases)	Grupo asignado	Marcos de lectura abiertos (ORFs)	Referencia
pHD-3a3b	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	2.0	I	Rep	McDowell y Mann, 1991
pHD2	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	2.0	I	Rep	Marin <i>et al.</i> , 1992
pTX14-1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	5.4	III	Rep, Mob y proteína con similitud a la colágena	Andrup <i>et al.</i> , 2003
pTX14-2	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	6.8	No asignado	Rep, Mob y proteína con similitud a la colágena	Andrup <i>et al.</i> , 2003
pTX14-3	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	7.6	VII	Rep, Mob y proteína con similitud a la colágena	Andrup <i>et al.</i> , 1994
pGI1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> H1.1	8.2	No asignado	Rep, Mob y un sistema antídoto-veneno encontrado en el bacteriófago P1	Andrup <i>et al.</i> , 2003
pGI2	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> H1.1	9.6	VII	Rep, Mob y transposón <i>Tn4430</i>	Mahillon y Seurinck, 1988
pGI3	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> H1.1	11.3	III	Rep	Hoflack <i>et al.</i> , 1997
pUIBI-1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i>	4.7	No asignado	Rep y Mob	López-Meza <i>et al.</i> , 2003
pEMB2062	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>	5.4	I	Rep	Acceso GenBank AF050161

2. ANTECEDENTES

2.1 Características de la cepa INTA Mo14-4 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*

Dentro de un programa de búsqueda de cepas de *B. thuringiensis* con actividad insecticida nativas de Argentina en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Castelar, Buenos Aires, Argentina, diversos aislamientos obtenidos de suelo y polvo de silos de trigo, fueron caracterizados mediante pruebas bioquímicas y moleculares, con un énfasis en aquellos con características atípicas (basadas en la morfología del cristal parasporal, los niveles de toxicidad y la presencia de genes con capacidad para codificar proteínas con actividad insecticida). De estos aislamientos se caracterizó la cepa INTA Mo14-4, la cual se aisló a partir del polvo de silos de trigo y se identificó como *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (Benintende *et al.*, 1999). La cepa INTA Mo14-4 posee dos tipos de cristales parasporales, uno en forma de barra aplanada y otro con forma bipiramidal constituidos por proteínas de 34 y 130 kDa. Se han identificado también en la cepa INTA Mo14-4 los genes *cry1*, *cry2*, *cry5* y *cry7* que codifican para proteínas Cry y los genes *vip3A* que codifican para proteínas insecticidas solubles o Vip. Sin embargo, en esta cepa aún no se ha encontrado actividad tóxica hacia insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros; además, posee seis plásmidos, en un rango que va desde ~ 7 kb hasta ~ 86 kb (Benintende *et al.*, 1999; Franco-Rivera *et al.*, 2004).

Por otro lado, se detectó la presencia de intermediarios de ADNcs en extracciones totales de plásmidos de la cepa INTA Mo14-4 (Sánchez-Baca *et al.*, 2002). Posteriormente, mediante Southern blot y utilizando como sonda un fragmento de 2.9 kb del plásmido más pequeño de la cepa (denominado pBMBt1 ~ 7 kb), se demostró que los intermediarios de ADNcs derivaban del plásmido pBMBt1 y posiblemente un plásmido RC. Debido a este resultado, el objetivo de la presente investigación fue la caracterización molecular del plásmido pBMBt1 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4.

3. HIPÓTESIS

El plásmido pBMBt1 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4 posee elementos genéticos que le permiten replicarse mediante el mecanismo del círculo rodante.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

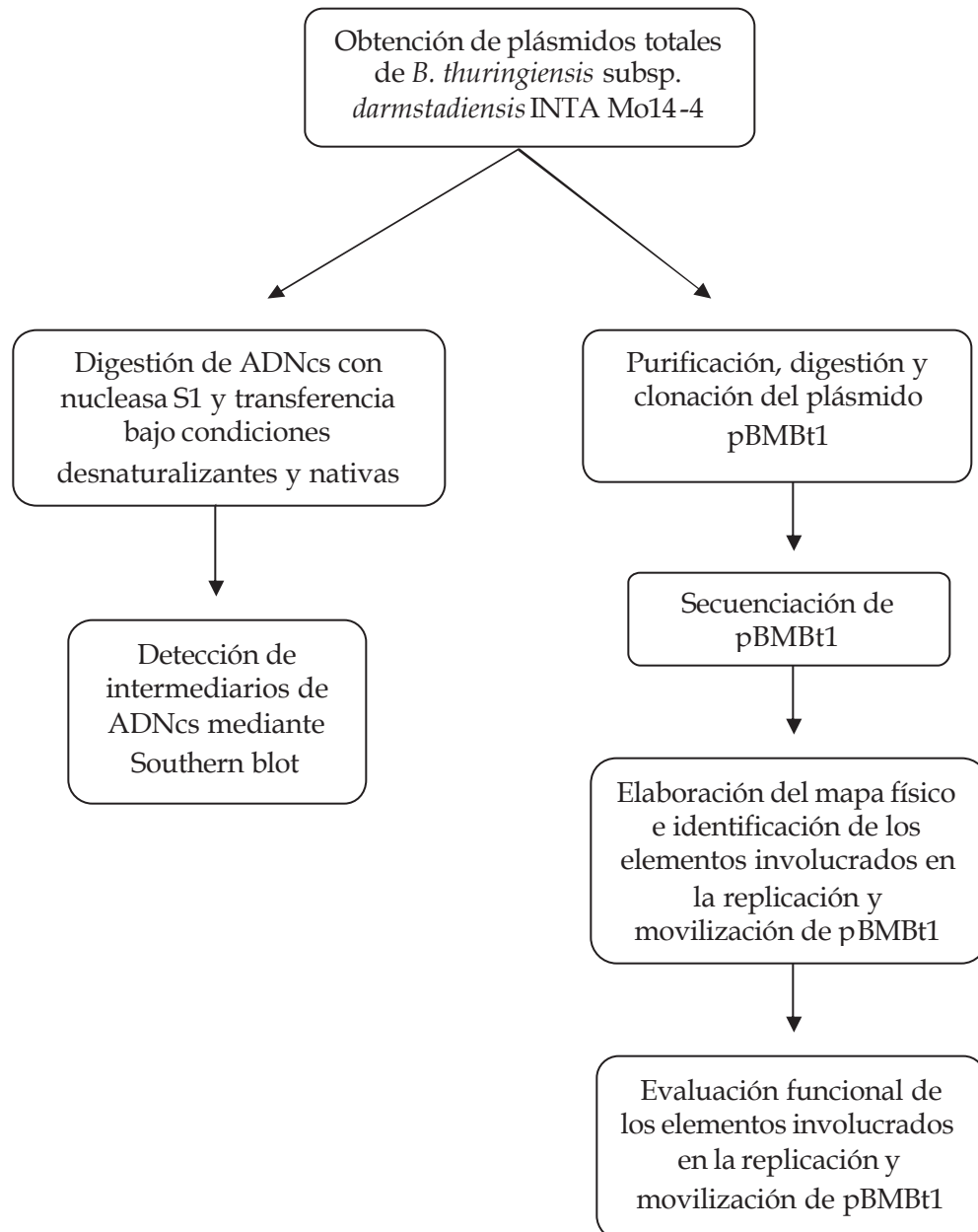
Caracterizar los elementos genéticos del plásmido pBMBt1 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Corroborar la presencia de intermediarios de ADNcs del plásmido pBMBt1 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4.
2. Determinar la secuencia de nucleótidos del plásmido pBMBt1 y establecer su organización genética.
3. Identificar los elementos genéticos involucrados en la replicación y posible movilización del plásmido pBMBt1.
4. Evaluar la función de los elementos genéticos involucrados en la replicación y posible movilización del plásmido pBMBt1.

5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

5.1 Diagrama general de la estrategia metodológica llevada a cabo en este trabajo de investigación



5.2 Obtención y purificación del plásmido pBMBt1 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4

Los plásmidos de la cepa INTA Mo14-4 se obtuvieron mediante lisis alcalina de acuerdo a un procedimiento descrito por (López-Meza *et al.*, 1995), en el cual las células se tratan con lisozima para obtener la lisis de la célula bacteriana y luego se realiza una desnaturalización alcalina selectiva del ADN cromosómico permitiendo que el ADN plasmídico persista como ADNdc. Después de una etapa de neutralización el ADN cromosómico permanece insoluble y el ADN plasmídico queda en forma soluble en el sobrenadante. El ADN se limpió por el método de bromuro de etidio/fenol (Stemmer, 1991), y el plásmido pBMBt1 de ~ 7 kb fue purificado utilizando el kit Gene Clean (Bio 101 Inc.).

5.3 Detección de intermediarios de ADNcs del plásmido pBMBt1, mediante hibridación tipo Southern y digestión diferencial con nucleasa S1

Se realizaron dos transferencias de ADN plasmídico de la cepa INTA Mo14-4 a membranas de nylon (NYTRAN). Una se realizó utilizando condiciones desnaturalizantes y la otra bajo condiciones nativas. La hibridación se realizó a 65°C. Se utilizó como sonda el fragmento *EcoRI* de 2.9 kb del plásmido pBMBt1. Previo a la electroforesis de los plásmidos, se incubó con la enzima nucleasa S1 la cual degrada específicamente ADNcs (López-Meza *et al.*, 2003).

5.4 Clonación y determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pBMBt1

El plásmido pBMBt1 fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Los productos de la digestión fueron clonados de manera independiente en el vector pBluescript II KS (+). Las construcciones generadas se utilizaron para obtener la secuencia de nucleótidos de pBMBt1. La secuencia fue determinada por el método de terminación de cadena con dideoxirribonucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), en un equipo de secuenciación automática ABI PRISM 310. Se utilizó el kit BigDye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems). La estrategia de secuenciación

consistió en la utilización de oligonucleótidos dirigidos a zonas del vector y posteriormente se diseñaron oligonucleótidos de las secuencias obtenidas. De esta manera se obtuvo la secuencia de cada región del plásmido con al menos dos repeticiones (Figura 6).

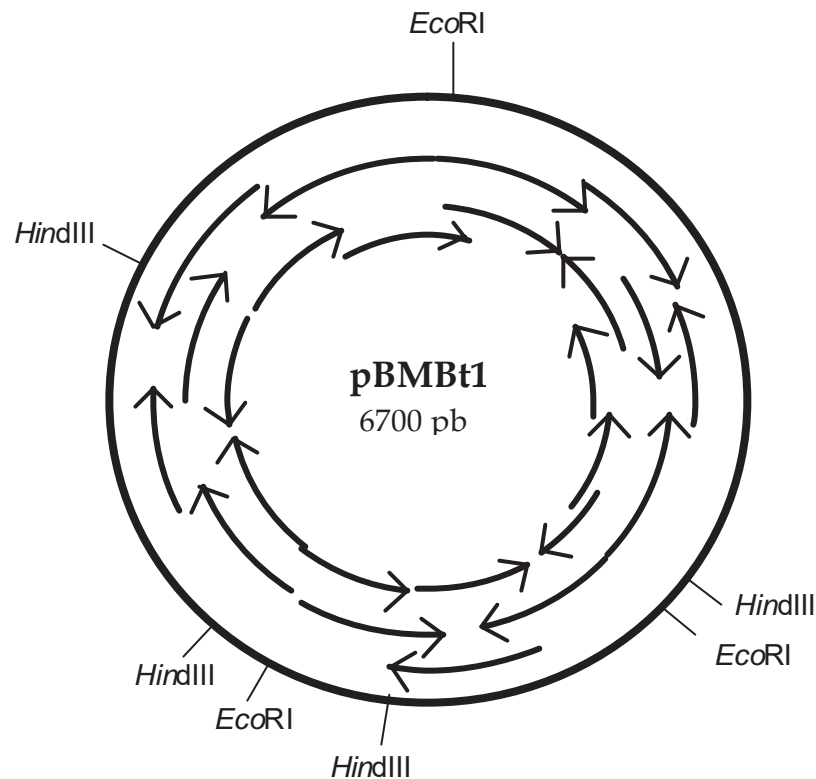


Figura 6 Estrategia de secuenciación del plásmido pBMBt1. Las flechas indican cada una de las lecturas obtenidas. Se muestran los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

La secuencia se analizó utilizando el Software Sequencing Analizes v3.0 y los programas DNAsis v2.0, DNASTAR y BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). De esta manera, se realizaron los empalmes de secuencia, se estableció el mapa físico, se tradujo la información a aminoácidos y se identificaron los elementos genéticos involucrados en la replicación y movilización del plásmido pBMBt1.

5.5 Construcción del plásmido pHT *mob14-4*

Con el fin de evaluar funcionalmente los elementos genéticos *mob14-4-oriT* involucrados en la movilización de pBMBt1, éstos fueron amplificados por PCR. El producto de PCR (~ 2.5 kb) fue clonado en el vector binario pHT3101 (Figura 7A) (Lereclus *et al.*, 1989) y se obtuvo la construcción pHT*mob14-4* (Figura 7C). Esta construcción fue introducida por electroporación en la cepa HD-73 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Wilks *et al.*, 1998). Una de las colonias transformantes fue utilizada como donadora. Por otra parte, mediante dilución en placa se obtuvieron colonias mutantes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7 (cepa acristalífera y curada de plásmidos) resistentes a gentamicina (Gm^R). Una de estas mutantes fue utilizada como receptora. De esta manera, se realizaron ensayos de conjugación en caldo nutritivo y se evaluaron los elementos *mob14-4* y *oriT* (Hu *et al.*, 2004). La frecuencia de transferencia del plásmido fue estimada de acuerdo al número de transconjugantes obtenidas por el número total de células distribuidas en cajas Petri. Además, se analizó la producción de cristales por parte de las transconjugantes mediante la observación de los mismos en el microscopio de contraste de fases.

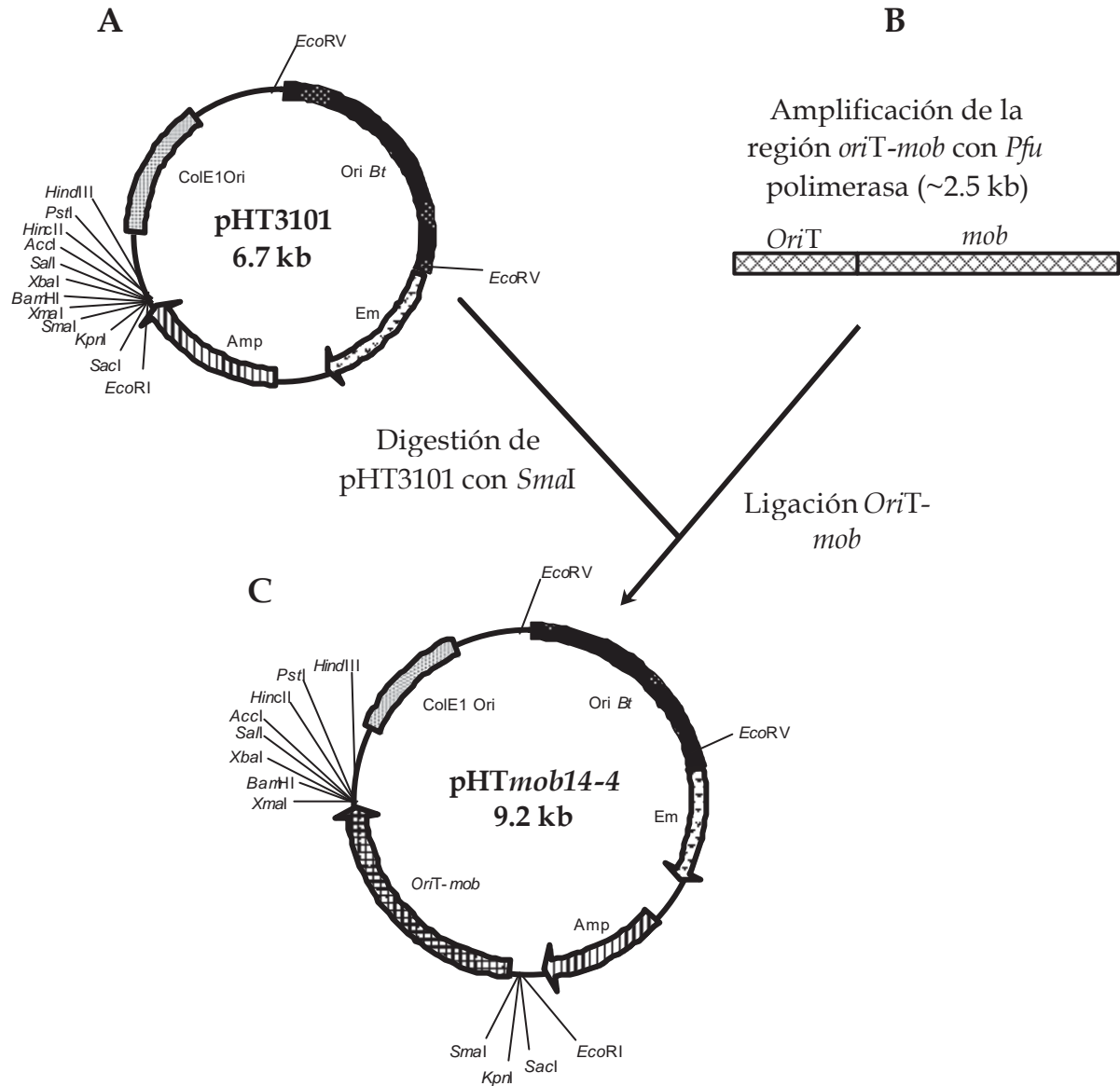


Figura 7. Estrategia general para la construcción del plásmido pHT*mob14-4*. A) Vector pHT3101 bifuncional para *B. thuringiensis* y *E. coli*. B) Amplificación de la región de movilización (*oriT-mob*) del plásmido pBMBt1 de *B. thuringiensis* subs. *darmstadiensis*. C) Plásmido pHT*mob14-4* (contiene los elementos *oriT-mob* de pBMBt1). Ori Bt = Origen de la replicación para *B. thuringiensis*; ColE1 ori = Origen de la replicación para *E. coli*; Em = Gen de resistencia a eritromicina; Amp = Gen de resistencia a ampicilina. Se muestran los sitios de restricción para diversas enzimas; Las flechas indican la dirección de la transcripción.

6. RESULTADOS

The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene



The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene

Pedro D. Loeza-Lara ^a, Graciela Benintende ^b, Jorge Cozzi ^b,
Alejandra Ochoa-Zarzosa ^a, Victor M. Baizabal-Aguirre ^a,
Juan J. Valdez-Alarcón ^a, Joel E. López-Meza ^{a,*}

^a Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Apdo. Postal 53, Administración Chapultepec,
C.P. 58262 Morelia, Michoacán, Mexico

^b Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, CC25, (1712) Castelar, Argentina

Received 9 February 2005, revised 25 April 2005

Available online 20 June 2005

Communicated by Manuel Espinosa

Abstract

This work describes a novel rolling-circle replicating (RCR) plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) encoding an insecticidal crystal protein-like gene. pBMBt1 (6700 bp) contains three ORFs and their putative transcription initiation sites and Shine-Dalgarno sequences were localized. ORF1 encodes a 34.6 kDa protein which showed identity with the protein CryC53 from *B. thuringiensis* subsp. *cameroun* (24.6%), the Cry15Aa insecticidal crystal protein from *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* (21.9%) and the Mtx3 protein from *Bacillus sphaericus* (27.8%). The ORF2 (52.3 kDa) showed a 74% identity with the Mob protein coded by pUIBI-1 from *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* and 64% identity with the Mob protein of pBMY1 from *Bacillus mycooides*; both Mob proteins belong to the pMV158 superfamily. To evaluate the Mob protein, the plasmid pHTMob14-4 was constructed. This plasmid shows transfer frequencies of 9.1×10^{-6} in *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (4Q7Gm^R). The ORF3 (23.6 kDa) gene product is homologous to the Rep protein from the plasmid pBMYdx of *B. mycooides* (37.6%). A putative double-strand origin with significant homology to that of *B. thuringiensis* plasmids, and an *ssxA*-type single-strand origin were also identified. Detection of single-stranded pBMBt1 DNA replicating intermediaries suggests that replication occurs via the rolling-circle mechanism. © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Fax: +52 443 295 80 29.

E-mail addresses: elmeza@zeus.umich.mx (J.E. López-Meza), jelopezm@hotmail.com (J.E. López-Meza).

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Insecticidal crystal protein; Rolling-circle replication; RCR plasmid

1. Introduction

During the sporulation the Gram positive bacterium *Bacillus thuringiensis* produces delta endotoxin proteins coded by *cry* genes and are toxic against insects (Höfte and Whiteley, 1989). A common characteristic of many strains of *B. thuringiensis* is the presence of a complex arrangement of plasmid DNA. The number and size of these plasmids (2–250 kb) vary considerably among strains (González and Carlton, 1980; Lereclus et al., 1982; McDowell and Mann, 1991). In contrast to the abundant information related to the *cry* genes coding for the delta endotoxins located on large plasmids, little information has been obtained from these plasmids and their contribution to the biology of their host.

In *B. thuringiensis*, most small plasmids (<15 kb) have been considered as “cryptic,” because their functions are unknown. The functions attributed to these widely distributed plasmids have been the replication and mobilization. Most small, multicopy plasmids from Gram-positive bacteria replicate by an asymmetric rolling-circle mechanism producing single-stranded DNA intermediates (Khan, 1997). Based on similarities of replication proteins (Rep) these plasmids are classified in at least 17 Groups (http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR/DPR_RCRdata.htm).

To date, several sequences contained in small RCR plasmids of *B. thuringiensis* have been reported. Plasmids pHD-3a3b and pHD2 from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, have functions related specifically with the replication and maintenance and belong to RCR Group I (Marin et al., 1992; McDowell and Mann, 1991). Sequence analysis of the plasmids pTX14-1, pTX14-2, and pTX14-3 isolated from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, revealed three main ORFs which encode for a Rep protein, a mobilization protein (Mob), and a collagen-like-protein (Andrup et al., 2003; Madsen et al., 1993). pTX14-1 belongs to RCR Group III and is mobilized by conjugative plasmid (pXO16) (Andrup et al., 1994; Boe et al., 1991). pTX14-2 shows significant homology to members of the

RCR Group VII (pTX14-3 and pGI2) and contains a collagen-like gene (Andrup et al., 2003). On the other hand, pTX14-3 (RCR Group VII) shows sequences encoding the proteins involved in replication and mobilization and a sequence encoding a putative protein with high similarity to various collagens (Andrup et al., 1994).

Molecular characterization of pGI1, pGI2, and pGI3 plasmids isolated from *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain H1.1 revealed interesting characteristics. pGI1 contains three ORFs that encode the Rep protein, a Mob protein and a poison component of a poison-antidote system found in the P1 bacteriophage and belongs to RCR Group III (Andrup et al., 2003; Mahillon et al., 1988). pGI2 (RCR Group VII) is the second smallest of these plasmids and harbors three ORFs. The first ORF encodes for the Rep protein, the second encodes for a Mob protein and the third contains the transposon Tn4430 encoding a TnpI recombinase, a member of the phage integrase family of site-specific recombinases, similar to plasmids pHT1000 and pHT1030 of *B. thuringiensis* (Hoflack et al., 1999). pGI3, the largest of the three plasmids, belongs to RCR Group VI, and contains at least 11 putative ORFs. The ORF6 encodes for the Rep protein (Andrup et al., 2003; Hoflack et al., 1997). Recently, the pUIBI-1 plasmid from *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* was shown to contain at least seven ORFs. Among the ORFs characterized, the ORF1 encodes for a Rep protein (lacks homology with Rep proteins) and the ORF2 encodes a Mob protein (López-Meza et al., 2003).

Although most of the low molecular weight plasmids in *B. thuringiensis* are classified as RCR, so far, there are no reports about the presence of *cry* genes in them. *cry* genes have been found in large plasmids, which duplicate their genetic material through the theta mechanism. The plasmid pBtoxis from *B. thuringiensis* contains several *cry* genes; however, its replication mechanism has not been characterized (Berry et al., 2002).

Several isolates of *B. thuringiensis* from Argentina in a nationwide screening program were

characterized. One strain of *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) showed novel features; a bar-shaped inclusion, a slender bipyramidal crystal and the presence of a novel combination of insecticidal genes. This strain did not show toxicity against lepidopteran, dipteran, and coleopteran targets. Moreover, a total of six plasmids were observed in this strain (Benintende et al., 1999; Franco-Rivera et al., 2004).

This paper reports the cloning and analysis of the sequence of the smallest plasmid from INTA Mo14-4, pBMBt1 (6700 bp). pBMBt1 presents all the features of plasmids that replicate by the rolling-circle mechanism, which suggests that pBMBt1 is an RCR plasmid. pBMBt1 also contains three putative ORFs, one of them showed identities with the Cry15Aa insecticidal crystal protein (21.9%) and CryC53 protein (24.6%) from *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* and *B. thuringiensis* subsp. *cameroun*, respectively. To our knowledge, this is the first report of an RCR plasmid from *B. thuringiensis* which encodes an insecticidal crystal protein.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria

Bacillus thuringiensis subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4 strain was isolated using PEMBA medium from samples of stored wheat dust, collected from Buenos Aires province mills (Benintende et al., 1999). *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7 (plasmid cured) were used in mating experiments and were obtained from CMEB's stock collection in Morelia, México. All strains were grown in nutrient agar. Gentamicin-resistant mutants of 4Q7 strain were isolated by plating bacteria LB on agar plates containing 20 µg/ml gentamicin. In mating experiments, one mutant (4Q7Gm^R) was used as the recipient and the HD-73 strain transformed with the plasmid pHTMob14-4, was used as the donor.

Escherichia coli XL1-Blue cells (Stratagene) used for DNA manipulation were transformed by heat shock (Sambrook and Russell, 2001). *E. coli* was cultured in Luria broth medium (LB).

2.2. Plasmid purification

Plasmid DNA from the *B. thuringiensis* strain was obtained according to the procedure previously described (López-Meza et al., 1995). The bacteria culture was grown to an OD₆₀₀ = 0.8 in Spizizen medium (Spizizen, 1958) supplemented with 0.5% glucose, 0.1% casaminoacids, and 0.1% yeast extract. Vegetative cells were washed in TE buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.8); the pellet was resuspended and incubated in a medium containing 0.5 M sucrose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, and 10 mg/ml lysozyme, pH 8.0, for 30 min at 37 °C. After 10 min incubation in ice, lysis solution was added (0.2 N NaOH, 1% SDS) and incubated for 5 min. Precipitation step was performed by adding 3 M sodium acetate (pH 4.8) for 20 min at –20 °C. The suspension was pelleted by centrifugation at 12,000 rpm in a Beckman JA25 rotor for 20 min; the supernatant was incubated with two volumes of ethanol for 20 min at –80 °C. The DNA obtained was pelleted by centrifugation as described above and resuspended in TE buffer. Plasmid DNA was purified with ethidium bromide and phenol as described by Stemmer (1991). The DNA quality was analyzed by electrophoresis in 0.6% agarose gel.

2.3. Cloning and DNA sequencing of plasmid pBMBt1

The plasmids of the INTA Mo14-4 strain were separated by electrophoresis in 0.6% agarose gel, and then pBMBt1 purified by Gene Clean (Bio 101). Single and double restriction enzyme digestions were performed to construct a partial restriction map, following the manufacturer's instructions (Invitrogen). The plasmid pBMBt1 was then digested separately with *EcoRI* and *HindIII* restriction enzymes. All fragments were cloned separately into the *EcoRI* and *HindIII* sites of pBluescript II KS(+) vector to obtain the clones used to determine the sequence (Table 1). To confirm the identity of the fragments cloned into pBluescript II KS(+), Southern blot was carried out using the plasmid pBMBt1 as probe.

Table 1
Bacterial strains and plasmids

Strains	Relevant characteristics	Reference
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacI^q, ΔM15, Tn 10 (Tet^r)]</i>	Stratagene
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> (INTA Mo14-4)	Host of plasmid pBMBt1	Benintende et al. (1999)
Plasmids		
pBluescript II KS(+)	ColE1, Am ^r , <i>lacZ</i> , α-complementation	Stratagene
pHT3101	ColE1, OriBt, Em ^r , <i>lacZ</i>	Lereclus et al. (1989)
pBMBt1	6700 bp; INTA Mo14-4	This work
pE1.4	pBsKS(+), 1.4 kb <i>EcoRI</i> pBMBt1	This work
pE2.5	pBsKS(+), 2.5 kb <i>EcoRI</i> pBMBt1	This work
pE2.9	pBsKS(+), 2.9 kb <i>EcoRI</i> pBMBt1	This work
pH3.5	pBsKS(+), 3.5 kb <i>HindIII</i> pBMBt1	This work
pH1.4	pBsKS(+), 1.4 kb <i>HindIII</i> pBMBt1	This work
pH1.2	pBsKS(+), 1.2 kb <i>HindIII</i> pBMBt1	This work
pH0.6	pBsKS(+), 0.6 kb <i>HindIII</i> pBMBt1	This work
pHTMob14-4	pHT3101, 2.5 kb <i>mob</i> 14-4 pBMBt1	This work

The nucleotide sequence of plasmid pBMBt1 was determined for both strands by the dideoxy-chain termination method (Sanger et al., 1977) in an automated ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Sequencer (Perkin-Elmer) using synthetic oligonucleotide primers and a BigDye terminator sequencing kit v 3.1 (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of plasmid pBMBt1 were analyzed with the DNAsis 2.0 (Hitachi) and Clustal V program of the MegAlign analysis software (DNASTar) and the National Center for Biotechnology Information BLASTN server (Altschul et al., 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.4. Detection of ssDNA intermediates by hybridization and digestion with S1 nuclease

Approximately 1 μg (5 μl) of total plasmid DNA of *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) was digested with 1 U of the ssDNA specific S1 nuclease (Invitrogen). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 20 min. Digested and non-digested plasmidic samples were electrophoresed in 0.6% agarose gels and transferred to Nylon membranes

(NYTRAN), under denaturing as well as non-denaturing conditions, as previously described (López-Meza et al., 2003). ssDNA intermediates were detected by hybridization with a pBMBt1-derived 2.9 kb *EcoRI* fragment, labeled with digoxigenin (Roche). Hybridization was performed in 5× SSC at 65 °C overnight. Membranes were washed twice in 2× SSC, 0.1% SDS at room temperature; and twice in 0.5× SSC, 0.1% SDS, at 65 °C, 15 min each. Membranes were exposed to Kodak X-Omat XAR-5 films.

2.5. Construction of plasmid pHTMob14-4

The plasmid pHTMob14-4 was constructed and used for analysis of mobilization in *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7 (Table 1). The *mob14-4* gene was obtained by PCR with *Pfu* DNA polymerase (Invitrogen) using plasmid pBMBt1 and primers 5'-TTTTGAGTTTATACCTCT-3' and 5'-TTAA TTGCTTGGAAAAAG-3'. The PCR product (~2.5 kb) was cloned into the *SmaI* site of the pHT3101 vector to obtain plasmid pHTMob14-4 which confers erythromycin resistance and then was introduced into *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 strain by electroporation as described

previously (Lereclus et al., 1989). Recombinant strain was selected on nutrient agar containing erythromycin (25 µg/ml) and considered as donor in mating experiments.

2.6. Conjugal mating in broth

To study the function of *mob14-4* gene, conjugal mating experiments were performed. The mutant 4Q7Gm^R was used as the recipient and the HD-73 (pHTMob14-4) strain was used as the donor. The method of plasmid transfer in broth cultures was similar to that described by Hu et al. (2004). Donor and recipient strain cultures were grown separately at 30 °C with shaking in LB broth containing the appropriate antibiotic until reaching an OD₆₀₀ of 1.0. Two hundred and fifty microliters of each culture was added to 7 ml of fresh prewarmed broth without antibiotics and incubated at 30 °C, with moderate shaking (40 rpm). As a control each *B. thuringiensis* strain was incubated alone. After 3 h cultures were diluted and plated onto LB agar containing 20 µg/ml gentamicin and 25 µg/ml erythromycin. Donor and recipient controls grown separately were plated in parallel on selective media. Plates were incubated for 96 h at 30 °C until colonies were clearly visible. Plasmid transfer frequency was estimated as the number of transconjugants per recipient plated and was corroborated for crystal production.

2.7. Nucleotide sequence accession number

The plasmid pBMBt1 nucleotide sequence determined in this work has been submitted to GenBank under Accession No. AY822042.

3. Results and discussion

3.1. Cloning and structural organization of plasmid pBMBt1

Bacillus thuringiensis subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) harbors six plasmids (Benintende et al., 1999). Restriction endonuclease analysis of pBMBt1, the smallest native plasmid of this strain,

indicated one single restriction site for *Pst*I, three sites for *Eco*RI, and four sites for *Hind*III. The physical and genetic map is shown in Fig. 1.

To obtain the complete sequence, plasmid pBMBt1 was subcloned in three separate *Eco*RI fragments (pE1.4, pE2.4, and pE2.9) and four separate *Hind*III fragments (pH0.6, pH1.2, pH1.4, and pH3.5) into the *E. coli* plasmid pBluescript II KS(+), (Table 1). The sequence of pBMBt1 was obtained by overlapping the sequences of the different clones. The complete sequence of plasmid pBMBt1 demonstrated that it is a circular DNA molecule of 6700 bp. The GC content of 32%, is consistent with the GC percentage for *B. thuringiensis* (Claus and Berkeley, 1986).

When the sequence of pBMBt1 was submitted to the GenBank database we found that some regions of pBMBt1 had the highest identity with some regions characteristic of RCR plasmids such as pBMY1 and pBMYdx of *B. mycooides*; pUIBI-1 of *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*; pTX14-3 of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* and with insecticidal genes of *B. thuringiensis* and *B. sphaericus* (see below).

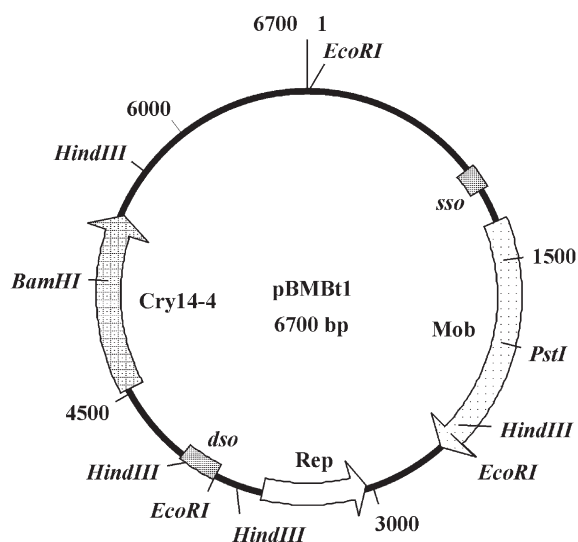


Fig. 1. Physical map and genetic organization of the plasmid pBMBt1. Hollow arrows indicate the orientation and location of putative ORFs, including those that probably encode Rep, Mob, and Cry14-4 proteins. Shaded bars indicate the replication origins *dso* and *sso*. Restriction sites were determined by endonuclease digestion and confirmed by sequence analysis.

3.2. Open reading frames of plasmid pBMBt1

Sequence analysis of plasmid pBMBt1 revealed three putative open reading frames (ORFs) with a coding capacity of more than 100 amino acids. When the amino acid sequences of these ORFs were compared separately with sequences in the GenBank database, the three ORFs showed homology with other registered sequences.

The putative ORF1 (nucleotides 4508–5458, 34.6kDa) gene product, denominated *cry14-4*, showed the highest identity with the CryC53 protein from *B. thuringiensis* subsp. *cameroun* (24.6%) and with the Cry15Aa insecticidal crystal protein from *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* (21.9%). An amino acid alignment analysis of the Cry14-4 and CryC53 proteins is shown in Fig. 2A. Cry14-4 showed also 27.8% identity with the Mtx3 proteins

from *B. sphaericus*. An amino acid alignment analysis of the Cry14-4 and consensus of Mtx proteins is shown in Fig. 2B. Cry15Aa has significant homology to Mtx2 and Mtx3 proteins from *B. sphaericus*. It is toxic to the lepidopteran *Manduca sexta*, and is found in crystals along with an unrelated protein of apparent molecular weight of 40kDa (Brown and Whiteley, 1992). CryC53 is also homologous to proteins of the Mtx2/Mtx3 group (Juárez-Pérez et al., 1994). Mtx2 and Mtx3 toxins are widely distributed in mosquitocidal *B. sphaericus* strains that are closely related to each other and, more distantly, to several *B. thuringiensis* crystal proteins. These proteins have regions of significant homology with the 33 kDa epsilon toxin of *Clostridium perfringens* and the 31.68 kDa cyto-toxin of *Pseudomonas aeruginosa* and constitute a family (Thanabalu and Porter, 1996). In regard to



Fig. 2. (A) Comparison of amino acid sequences between the Cry14-4 protein from plasmid pBMBt1 of *B. thuringiensis* subsp. *darmstadtensis* (INTA Mo14-4) and CryC53 protein of *B. thuringiensis* subsp. *cameroun*. Single dots indicate similar amino acids. Letters in bold indicate conserved amino acids. (B) Comparison of amino acid sequences between the Cry14-4 protein from plasmid pBMBt1 and Mtx family from *Clostridium* epsilon toxin/*Bacillus* mosquitocidal toxin. Letters in bold indicate conserved amino acids.

the structure of the *cry14-4* gene it was found a region preceded by a putative Shine-Dalgarno region (5'-TAAAAGGAGA-3') located 2 nucleotides upstream from the ATG. The putative promoter region of *cry14-4* contains two sequences with an 18-nucleotides spacer, 5'-TTGAAT-3' and 5'-TATGAT-3', located 54 and 30 nucleotides from the ATG, respectively, which could correspond to the -35 and -10 sequences of a prokaryotic promoter (Moran et al., 1982).

It is worth noting that the insecticidal crystal protein genes are generally present in the large plasmids of *B. thuringiensis* (González et al., 1982). Interestingly, this is the first report about an RCR plasmid (pBMBt1) from *B. thuringiensis* which harbors an insecticidal crystal protein-like gene (*cry14-4*). Several factors are relevant considering the evolution and distribution of *B. thuringiensis* toxins: the Cry proteins of *B. thuringiensis* are clustered into groups of related sequences, and closely related toxins share significant homology at the nucleotide level that may allow homologous recombination (Crickmore et al., 1998). Even among more distantly related toxins, we find blocks of homology that may also permit rearrangement of toxin gene sequences (Höfte and Whiteley, 1989). Furthermore, most *B. thuringiensis* toxin genes are located close to sequences that appear to be related to transposition (Mahillon et al., 1994). These features provide a pathway for mobilizing the toxin sequences between plasmids and the host chromosome and among resident plasmids. Such transposition would lead to new toxin gene assortments to be assembled within individual *B. thuringiensis* strains. The recently published nucleotide sequence of pBtoxis, a toxin-coding plasmid from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, shows numerous transposition-related sequences, suggesting that this process is involved in the movement of toxins and in the evolution of the plasmids on which they are carried (Berry et al., 2002). In RCR plasmids from *B. thuringiensis*, the presence of transposition sequences has also been reported for the plasmid pGI2 which harbors the transposon *Tn* 4430 (Andrup et al., 2003; Hoflack et al., 1997). These events may explain the presence of *cry14-4* gene that codes for an insecticidal crystal protein-like in an RCR plasmid (pBMBt1). The

analysis of the pBMBt1 sequence to identify insertion sequences, confirmed that not transposition-related sequences are present. The origin of the *cry14-4* gene in the RCR plasmid remains unknown; therefore, pBMBt1 is a putative mobilizable plasmid. So, the *cry14-4* gene could have been brought by recombination with the conjugative plasmid.

The ORF2 (nucleotides 1270–2604, 52.3 kDa) showed 74% identity with a Mob protein coded by plasmid pUIBI-1 from *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (López-Meza et al., 2003), and 64% identity with a Mob protein from pBMY1 plasmid from *B. mycoides* (Di Franco et al., 2000). The Mob proteins are involved in the mobilization of small plasmids by “nicking” the plasmid and separating the double helix, which allows the transfer of RCR plasmids through cell connection (for a review see, e.g., Francia et al., 2004). Mob proteins from plasmids pUIBI-1 and pBMY1 are included into the pMV158 superfamily. The members of this family show the motif HxxR, which is new among the Mob proteins, and the motif HxDE, which is probably a variant of the three conserved His residues (3H motif) of Mob proteins. Both motifs are invariant among the Mob proteins of pMV158 superfamily. In addition to these motifs, a third one with the sequence NY(D/E)L, is also present and contains the catalytic Tyr (Francia et al., 2004). The Mob protein from plasmid pBMBt1 shows the three motifs; an amino acid alignment of several Mob proteins is shown in Fig. 3A.

The organization of the mobilization region is similar in all members of the pMV158 superfamily. It is composed of a single gene, encoding the Mob protein, and the *oriT* site upstream, overlapping the Mob promoter. It has been demonstrated that only the *oriT* region and the *mobM* gene are indispensable for mobilization in pMV158 plasmid (Guzman and Espinosa, 1997). Analysis of this region in plasmid pBMBt1 shows highest sequence identity with the *oriT* of plasmid pUIBI-1 (79%) (Fig. 3B).

The putative ORF3 (nucleotides 3591–2992, 23.6 kDa) gene product, named *rep14-4*, is homologous to the replication protein (Rep) of small multicopy plasmids of Gram-positive bacteria. The highest sequence identity of *rep14-4* (37.6%) was

A

		Motif I			
pBMBt1	30	GNVQGLSNHWDRKTKKHSNL	49		
pUIBI-1	23	GNVQGLSIHWDRKTEENHSNL	47		
pBMY1	56	ANVQGLSIHWDRKTEIHTNK	75		
pGI2	15	SDVQGTQKHNRQGGKSKSNL	34		
PMV158	14	GNLGGAFKHNERVFEHNSNK	33		
		* * * *			

		Motif II		Motif III			
pBMBt1	51	IDKERSDLNYDLCQKGGDTL	70	129	KNVLSANVHMDETTPHMHFAL	149	
pUIBI-1	49	IDNERSDLNYDLCQKGGDTL	68	127	KNVLSANVHMDETTPHMHFAP	147	
pBMY1	77	IDVRSRHLNYDLCQKGGDSL	96	155	KNVICANVHNDETTPHMHFAP	175	
pGI2	36	IDYSKSEQNYDLDLNQQKIRY	55	116	QNTLYAMVHMDETTPHMHIGV	136	
PMV158	35	INPSRSHLNYELTDRDRSVS	54	118	SNIAYASVHLDSTPHMHMGV	138	
		* * ** *			* * ** ** *****		

B

		<i>oriT</i> Nick site			
			↓		
pBMBt1	1247	TTTGCCATAACGT	GCTAGGACAAA	1270	
pUIBI-1	1781	TTTGGTATAACGT	GCTAGACCATA	1804	
pBMY1	872	TTTGGTATAACGT	GCTACACCATT	895	
pGI2	7726	TTTGGTATAATGG	GCTATACCAA	7749	
PMV158	3583	TAAAGTATAGTGT	GTATACTTTA	3605	

Fig. 3. Comparison of Mob proteins from different plasmids of Gram-positive bacteria. (A) Motifs conserved among Mob proteins from the pMV158 superfamily. The motifs HxxR (motif I), NY(D/E)L (motif II), and HxDE (motif III) are shown. Asterisks indicate conserved amino acids. (B) Comparison of *oriT* from plasmids of the pMV158 superfamily. Arrow indicates the nick site.

found with a Rep protein of the plasmid pBMYdx of *B. mycoides* (Di Franco et al., 2000), as shown in Fig. 4. The *rep14-4* region is preceded by hexanucleotide sequences containing 5'-TAGATG-3' and 5'-TAATGT-3' motifs located 83 and 60 nucleotides from the ATG, respectively, and spaced by 16 non-conserved nucleotides, resembling the typical prokaryotic promoter consensus (Moran et al., 1982).

3.3. Identification of the putative double-strand origin of replication of plasmid pBMBt1

The DNA region of plasmid pBMBt1 located between nucleotides 3875 and 4077 exhibits

inverted repeated sequences that are typical of the double strand origin of replication (*dso*) of several RCR plasmids (Fig. 5). Alignment showed that this region shares 81.4% identity with the *dso* of plasmid pUIBI-1 (López-Meza et al., 2003) and 81.1% identity with the *dso* of plasmid pBMY1 (Di Franco et al., 2000). In RCR plasmids, the highly conserved *dsos*, which are important in the binding of Rep protein and the nicking of the double strand, are usually located immediately upstream of the *rep* gene. Therefore, we searched for the corresponding origin of replication in plasmid pBMBt1. Such sequence is located upstream of the *rep14-4* gene.

pBMBt1	1	MFKIYERSKNKTMKNENETDIKISKEEFMKIIELTGLPISHIQKLLID
pBMYdx	1	MVS-----EVLQDSEERKITVELTREELNKIQKLLD
pBMBt1	48	LEKAEQEEAKRKELEKKNPFVQLYKSHMKEIRWLITNHHLSSNILF
pBMYdx	33	FEDVKEKTEKQREEEKKNYFNFIQLYRDNPPELRWLMTKQPFAS SLFF
pBMBt1	94	FFLENNNRNVI VCSQQLLMEQFNKGRTTIHNAIKTLKEHGFI SVAK
pBMYdx	80	FILEHMDNRNALACSYSVFEDYFGKSRMTIYRAIKVLEENGFI DVLK
pBMBt1	141	IGNANAYIINPEIAFQDSRDKIKYVSFEGKILINKNENEEL-FKEHK
pBMYdx	127	MGTSNVYVUNEDLAWTDKNTSKKFAKYDGNILVSKKENKDYQYRSQ-
pBMBt1	187	FENLKVLEKDEK--K
pBMYdx	173	FDRFKALRERENLK

Fig. 4. Amino acid alignment of the putative Rep proteins from plasmid pBMBt1 of *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) and plasmid pBMYdx of *B. mycoides*. Letters in bold indicate conserved amino acids.

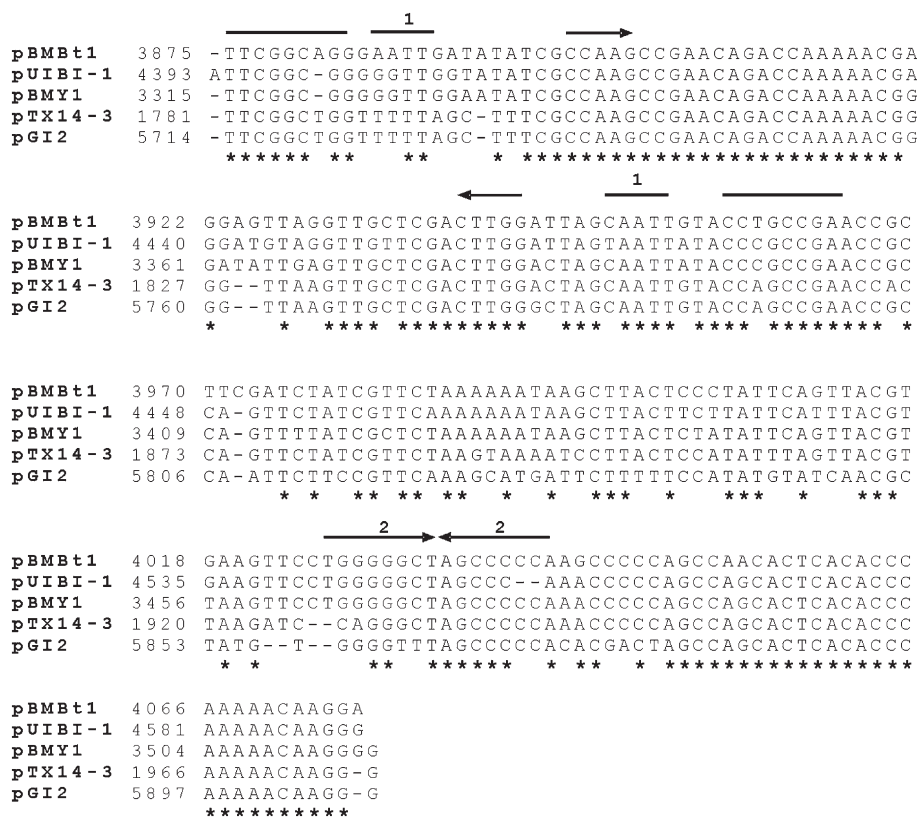


Fig. 5. *dso* of the plasmid pBMBt1. Sequence alignments of *dsos* of replication from RCR plasmids from *B. thuringiensis* and *B. myco-*
ides. Asterisks indicate conserved nucleotides. Number and arrows indicate inverted repeats.

3.4. Identification of the putative single strand origin of replication of plasmid pBMBt1

In addition to the *dso*, where the leading-strand synthesis initiates, RCR plasmids contain the single strand origin (*sso*) which is a signal involved in the synthesis initiation of the lagging-strand and is efficiently recognized by the machinery of its natural host (Kramer et al., 1995). Five types of *sso* (*ssoA*, *ssoL*, *ssoT*, *ssoU*, and *ssoW*) have been described in bacterial RCR plasmids (Kramer et al., 1999). A 161 bp region of plasmid pBMBt1 shows significant sequence identity to *ssos* of plasmids pBMSa1 (41%) and pC194 (40.4%) from *Staphylococcus aureus* (Horinouchi and Weisblum, 1982; Loeza-Lara et al., 2004). This region (bases 937–1098) contains four potential stem-and-loop structures, according to four palindromic imperfect sequences located throughout this region, and

is similar to those found in the plasmid pC194. Fig. 6 shows the location of these structures and its comparison to those in the plasmids pBMSa1 and pC194. The *sso* of plasmid pBMBt1 belongs to the *ssoA* type and consequently shows the highest homology to the pC194 plasmid family (Horinouchi and Weisblum, 1982).

3.5. Detection of ssDNA intermediates

In addition to the homology found in the putative *dso* and *sso* in plasmid pBMBt1 with other RCR plasmids, the finding of ssDNA replication intermediates strongly supports the assumption that this plasmid replicates by the rolling-circle process. To test this, Southern blotting under native conditions, combined with S1 nuclease digestion of ssDNA, was performed. Fig. 7A shows an agarose gel with plasmid pBMBt1, in both

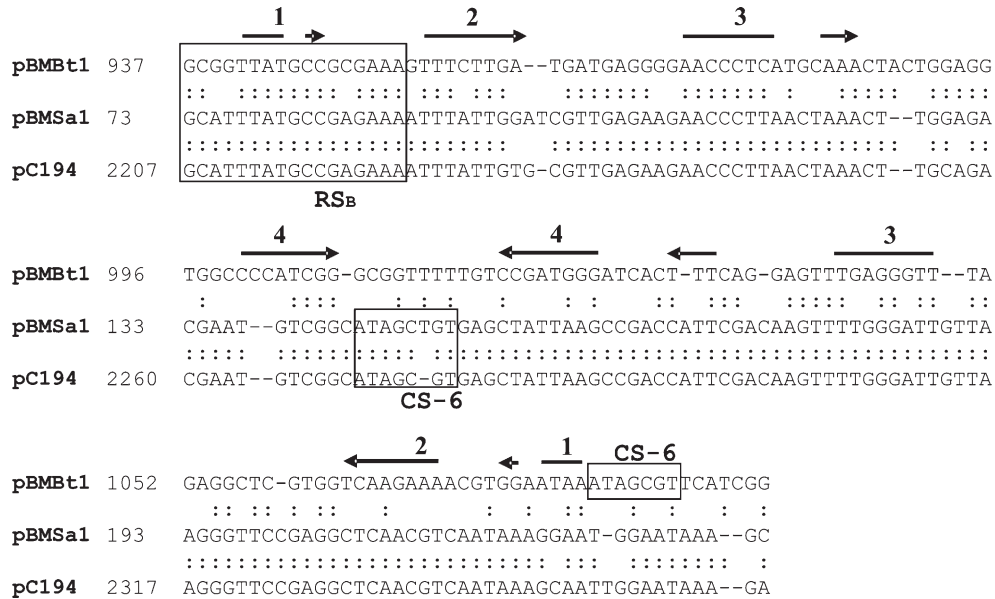


Fig. 6. Alignment of the putative *ssoA* origin of plasmid pBMBt1 with the corresponding region in plasmids pBMSa1 and pC194 of *S. aureus*. The two sequence elements of the pC194-*ssoA* that are conserved in many *ssoAs* (RS_B and CS-6) are boxed. Dots indicate nucleotides conserved in plasmid DNAs. Number and arrows indicate perfect and imperfect palindromic arrangements of bases.

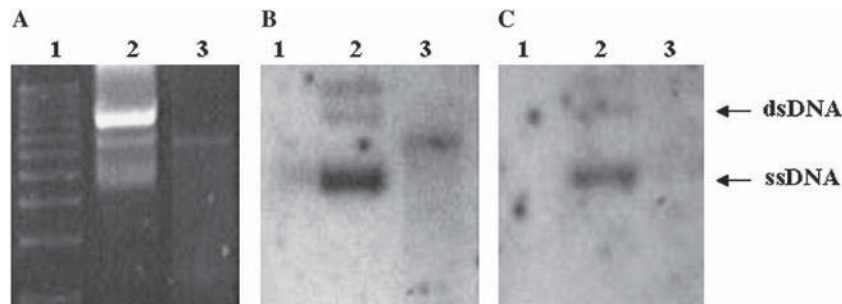


Fig. 7. Evidence of ssDNA intermediates in pBMBt1 plasmid replication. (A) EtBr-stained agarose gel of plasmid DNA preparations from pBMBt1 without (lanes 2) or with S1 nuclease (lanes 3). Lane 1, 1 kb DNA ladder (Invitrogen). (B) Southern blot, performed under denaturing conditions. (C) Southern blot, performed under native conditions. Both membranes were probed as described in the text. Bands representing single-stranded (ssDNA) and double-stranded (dsDNA) forms of plasmid pBMBt1 are indicated. The 2.9 kb *EcoRI* fragment of plasmid pBMBt1 was used as a probe.

undigested and digested conditions with S1 nuclease (lanes 2 and 3).

When plasmids were blotted on membranes under denaturing conditions all conformational structures of undigested plasmid pBMBt1 were detected, using the 2.9 kb *EcoRI* fragment of plasmid pBMBt1 as a probe (Fig. 7B, lane 2). However, when plasmid pBMBt1 was digested with the S1 nuclease the band with the highest electrophoretic mobility disappears (Figs. 7B and C, lanes 3), indi-

cating its ssDNA nature. These results indicate the presence of a pBMBt1 ssDNA intermediate in the plasmid preparations of *B. thuringiensis* INTA Mo14-4 strain.

3.6. Plasmid transfer in broth culture

To test the mobilization of plasmid pHT-Mob14-4, the conjugation system of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 was used. This system

mobilizes non-conjugative plasmids via a Mob-dependent mechanism (Wilcks et al., 1998). The plasmid pHTMob14-4 was transferred to recipient strain (4Q7Gm^R) by conjugation followed by selection on solid substrates containing erythromycin and gentamicin. None of the controls plated on substrate containing the antibiotics gave any colonies. We observed transfer frequencies of plasmid pHTMob14-4 of 9.1×10^{-6} (data are the mean number of transconjugants, $n = 2$). These results are in agreement with transfer frequencies for the pTX14-3 and pGI2 plasmids, which show transfer frequencies in the range of 10^{-3} and 10^{-7} (Hoflack et al., 1999).

In conclusion, pBMBt1 is an RCR plasmid from *B. thuringiensis* related to the RCR Group VII that encodes a *cry14-4* insecticidal crystal protein-like gene.

Acknowledgments

The authors thank the excellent technical support of Morelia Soto-Huipé. This work was supported by grants from Coordinación de la Investigación Científica (CIC-14.5, UMSNH) and CONACyT (38746-B, México) to J.E.L.M. P.D.L.L. was supported by a scholarship from UMSNH and CONACyT.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Andrup, L., Damgaard, J., Wassermann, K., Boe, L., Madsen, S.M., Hansen, F., 1994. Complete nucleotide sequence of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid pTX14-3 and its correlation with biological properties. *Plasmid* 31, 72–88.
- Andrup, L., Jensen, G.B., Wilcks, A., Smidt, L., Hoflack, L., Mahillon, J., 2003. The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmid from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. *Plasmid* 49, 205–232.
- Benintende, G.B., López-Meza, J.E., Cozzi, J.G., Ibarra, J.E., 1999. Novel non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 151–155.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A.F., Murphy, L., Quail, M.A., Holden, M.T.G., Harris, D., Zaritsky, A., Parkhill, J., 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5082–5095.
- Boe, L., Nielsen, T.T., Madsen, S.M., Andrup, L., Bolander, G., 1991. Cloning and characterization of two plasmids from *Bacillus thuringiensis* in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 25, 190–197.
- Brown, K.L., Whiteley, H.R., 1992. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. *J. Bacteriol.* 174, 549–557.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W., 1986. *Genus Bacillus*. Cohn, 1978, 144^{AL}. In: Sneath, P.H.A., Mair, M.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1105–1135.
- Crickmore, N., Zeigler, R.D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, H.D., 1998. Revision of the nomenclature for the *B. thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 6, 807–813.
- Di Franco, C., Pisaneschi, G., Beccari, E., 2000. Molecular analysis of two rolling-circle replicating cryptic plasmids, pBMYdx and pBMY1, from the soil Gram-positive *Bacillus mycooides*. *Plasmid* 44, 280–284.
- Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.A., Latorre, A., Drainas, C., de la Cruz, F., 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 79–100.
- Franco-Rivera, A., Benintende, G., Cozzi, J., Baizabal-Aguirre, V.M., Valdez-Alarcón, J.J., López-Meza, J.E., 2004. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 87–92.
- González, J.M., Brown, B.J., Carlton, B.C., 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6951–6955.
- González, J.M., Carlton, B.C., 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 3, 92–98.
- Guzman, L.M., Espinosa, M., 1997. The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J. Mol. Biol.* 266, 688–702.
- Hoflack, L., Seurinck, J., Mahillon, J., 1997. Nucleotide sequence and characterization of the cryptic *Bacillus thuringiensis* plasmid pGI3 reveal a new family of rolling circle replicons. *J. Bacteriol.* 179, 5000–5008.
- Hoflack, L., Wilcks, A., Andrup, L., Mahillon, J., 1999. Functional insight into pGI2, a cryptic rolling-circle replicating plasmid from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology* 145, 1519–1530.
- Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242–255.
- Horinouchi, S., Weisblum, B., 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* 150, 815–825.
- Hu, X., Hansen, B., Eilenberg, J., Hendriksen, N., Smidt, L., Yuan, Z., Jensen, G., 2004. Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a *cry1Ac* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 45–52.

- Juárez-Pérez, V.M., Jacquemard, P., Frutos, R., 1994. Characterization of the type strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *cameroun* serotype H32. FEMS Microbiol. Lett. 122, 43–48.
- Khan, S.A., 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 442–455.
- Kramer, M.G., del Solar, G., Espinosa, M., 1995. Lagging-strand origins of the promiscuous plasmid pMV158: physical and functional characterization. Microbiology 141, 655–662.
- Kramer, M.G., Espinosa, M., Misra, T.K., Khan, S.A., 1999. Characterization of a single-strand origin, *ssuU*, required for broad host range replication of rolling-circle plasmids. Mol. Microbiol. 33, 466–475.
- Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., Lecadet, M.M., 1989. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. 60, 211–218.
- Lereclus, D., Lecadet, M.M., Ribier, J., Dedonder, R., 1982. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. Mol. Gen. Genet. 186, 391–398.
- Loeza-Lara, P.D., Soto-Huipé, M., Baizabal-Aguirre, V.M., Ochoa-Zarzosa, A., Valdez-Alarcón, J.J., Cano-Camacho, H., López-Meza, J.E., 2004. pBMSa1 a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus* encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling circle mechanism. Plasmid 52, 48–56.
- López-Meza, J.E., Barboza-Corona, J.E., del Rincón-Castro, C., Ibarra, J.E., 2003. Sequencing and characterization of plasmid pUIBI-1 from *Bacillus thuringiensis* serovar *entomocidus* LBIT-113. Curr. Microbiol. 47, 395–399.
- López-Meza, J.E., Federici, B.A., Poehner, W.J., Martínez-Castillo, A., Ibarra, J.E., 1995. Highly mosquitocidal isolates of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae* and *entomocidus* from Mexico. Biochem. Syst. Ecol. 23, 461–468.
- Madsen, S., Andrup, L., Boe, L., 1993. Fine mapping and DNA sequence of replication functions of *Bacillus thuringiensis* plasmid pTX14-3. Plasmid 30, 119–130.
- Mahillon, J., Hespel, F., Pierssens, A.M., Delcour, J., 1988. Cloning and partial characterization of three small cryptic plasmids from *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 19, 169–173.
- Mahillon, J., Rezsöhazy, R., Hallet, B., Delcour, J., 1994. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. Genetica 93, 13–26.
- Marin, R., Tanguay, R.M., Valero, J., Letarte, R., Bellemare, G., 1992. Isolation and sequence of a 2-kbp miniplasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-3a3b: relationship with miniplasmids of other *B. thuringiensis* strains. FEMS Microbiol. Lett. 73, 263–269.
- McDowell, D.G., Mann, N.H., 1991. Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1-DIPEL. Plasmid 25, 113–120.
- Moran Jr., C.P., Lang, N., LeGrice, S.F.J., Lee, G., Stephens, M., Sonnenshein, A.L., Pero, J., Losick, R., 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet. 186, 339–346.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467.
- Spizizen, J., 1958. Transformation of biochemically different strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 1072–1078.
- Stemmer, W.P.C., 1991. A 20-minute ethidium bromide/high-salt extraction protocol for plasmid DNA. Biotechniques 10, 726.
- Thanabalu, T., Porter, A.G., 1996. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. Gene 170, 85–89.
- Wilcks, A., Jayaswal, N., Lereclus, D., Andrup, L., 1998. Characterization of plasmid pAW63, a second self-transmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD73. Microbiology 144, 1263–1270.

7. RESULTADOS ADICIONALES

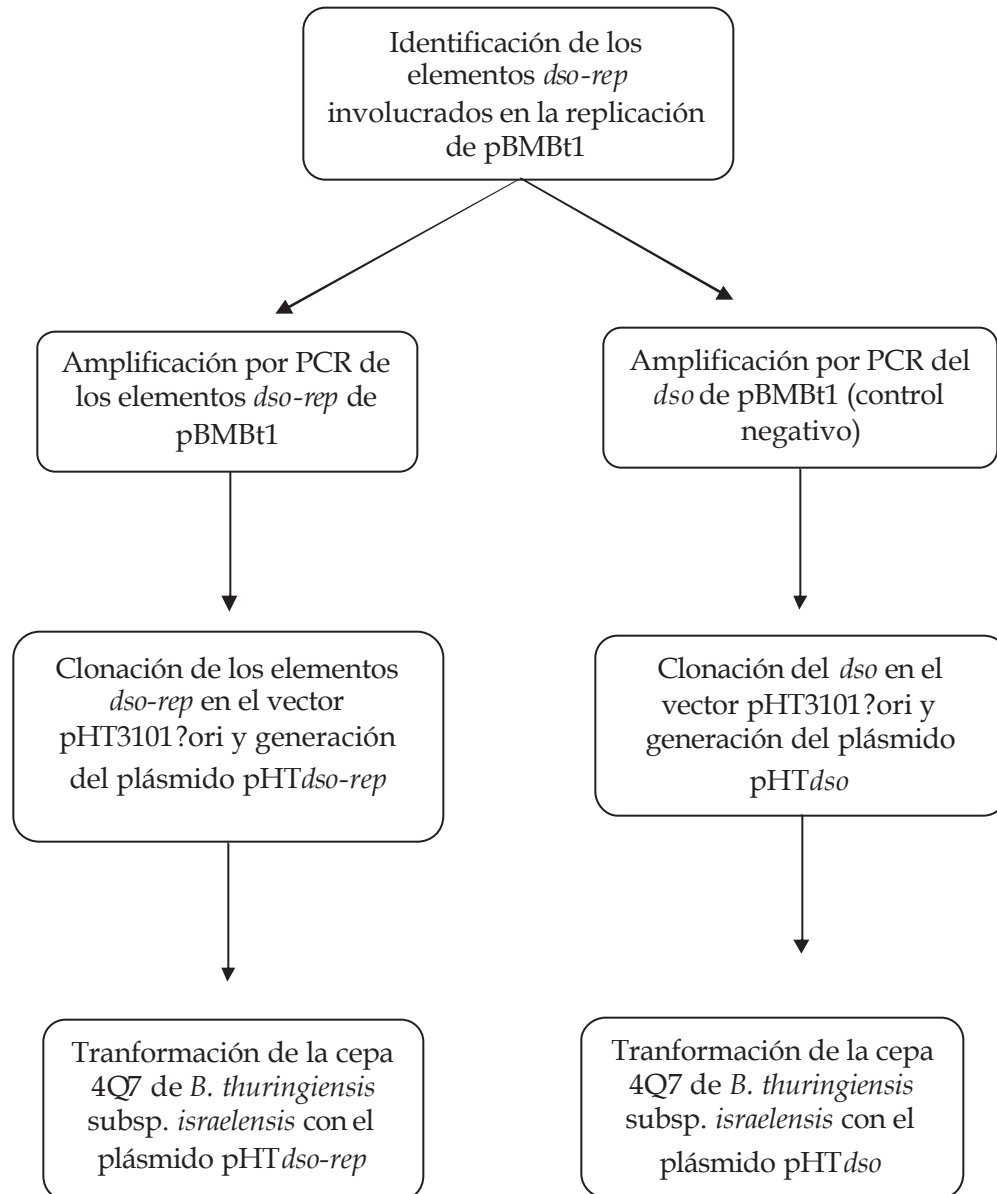
EVALUACIÓN DE LOS ELEMENTOS *dso-rep* INVOLUCRADOS EN LA REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO pBMBt1 DE *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4

7.1 INTRODUCCIÓN

La determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pBMBt1 (6.7 kb) de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4, la detección de intermediarios de ADNcs y la identificación de los elementos genéticos típicos de los plásmidos RC (el gen *rep* y los elementos *dso* y *sso*), demostraron que pBMBt1 es un plásmido que se replica mediante el mecanismo del círculo rodante (Loeza-Lara *et al.*, 2005).

Para diseñar y construir un vector de clonación para *B. thuringiensis*, tomando como base los elementos que participan en la replicación del plásmido pBMBt1, es necesario evaluar funcionalmente estos elementos genéticos. El objetivo de esta parte del trabajo de investigación fue evaluar la funcionalidad de los elementos *dso-rep* del plásmido pBMBt1 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4.

7.2 ESTRATEGIA METODOLÓGICA



7.2.1 Construcción del plásmido pHT3101?ori (vector desarmado para *B. thuringiensis*)

Para evaluar los elementos *dso-rep* del plásmido RC pBMBt1 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4 se diseñó un vector de clonación desarmado, al cual se le eliminó el origen de replicación para *B. thuringiensis*. Para este fin se utilizó el vector de clonación bifuncional pHT3101 (~ 6.7 kb), que posee un origen de replicación para *B. thuringiensis* y un origen de replicación para *E. coli* (ColE1) y que proporciona resistencia a eritromicina y a ampicilina (Figura 8A) (Lereclus *et al.*, 1989). Este vector fue digerido con la enzima *EcoRV*, la digestión liberó fragmentos de ~ 4.5 kb y de ~ 2.2 kb, este último contiene el origen de la replicación de *B. thuringiensis*. El fragmento de ~ 4.5 kb fue purificado, religado, electroporado en células de *E. coli* y denominado pHT3101?ori (Figura 8B). Para corroborar la eliminación del origen para *B. thuringiensis*, se transformó la cepa curada de plásmidos de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7 con esta construcción, verificando la ausencia de transformantes.

7.2.2 Construcción de los plásmidos pHT *dso-rep* y pHT *dso*

Para evaluar la funcionalidad de los elementos *dso-rep* involucrados en la replicación de pBMBt1, se realizó la amplificación por PCR de la región *dso-rep* utilizando los oligonucleótidos 5'-GTTCTGCAGCTCTGTATCTTGTATG-3' y 5'-TGTGGTACCAATAATATGCCCTCTC-3', que contienen los sitios de corte para las enzimas *PstI* y *KpnI* (en negritas), respectivamente. El producto de PCR (~ 1.1 kb) se clonó en los sitios *KpnI* y *PstI* del vector pHT3101?ori para obtener la construcción pHT*dso-rep* (Figura 8C). Como control se amplificó la región del *dso*, utilizando los oligonucleótidos 5'-TGTGGTACCAATAATATGCCCTCTC-3' y 5'-GCCCTGCAGCTTGTATTGGGGAATT-3' que contienen los sitios de corte para las enzimas *PstI* y *KpnI* (en negritas), respectivamente. El producto de PCR (232 pb) se clonó en el vector pHT3101?ori y se obtuvo la construcción pHT*dso* (Figura 8D).

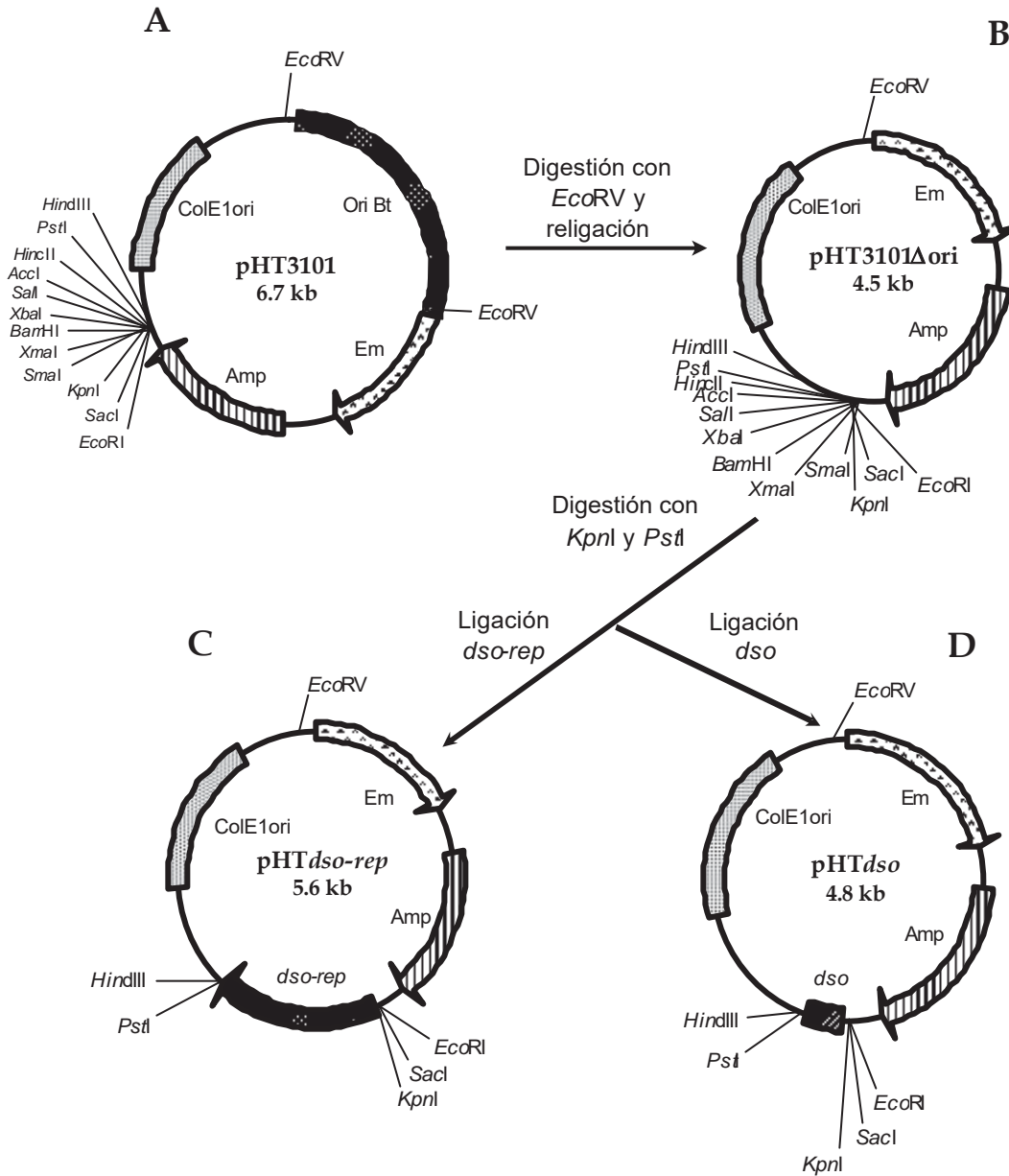


Figura 8. Estrategia general para la construcción de los plásmidos pHTdso-rep y pHTdso. A) Vector pHT3101 bifuncional para *B. thuringiensis* y *E. coli*. B) Vector desarmado pHT3101Δori (carece del origen de replicación para *B. thuringiensis*). C) Plásmido pHTdso-rep (contiene los elementos *dso-rep* de pBMBt1). D) Plásmido pHTdso (contiene el *dso* de pBMBt1). Ori Bt = Origen de la replicación para *B. thuringiensis*; ColE1 ori = Origen de la replicación para *E. coli*; Em = Gen de resistencia a eritromicina; Amp = Gen de resistencia a ampicilina. Se muestran los sitios de restricción para diversas enzimas; Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Las construcciones fueron seleccionadas en *E. coli* verificándose la identidad de las mismas mediante digestión y PCR. Estas construcciones se utilizaron para transformar (se adicionó 1 µg de ADN de cada construcción) por electroporación células de la cepa acristalífera y curada de plásmidos 4Q7 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Lereclus *et al.*, 1989). La funcionalidad de la proteína Rep y el origen *dso*, se determinó mediante la aparición de transformantes seleccionadas en medio LBA conteniendo 25 µg/ml de eritromicina.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Amplificación por PCR de los elementos *dso-rep* y *dso* y obtención de las construcciones pHT *dso-rep* y pHT *dso*

Para evaluar funcionalmente los elementos genéticos *dso-rep* del plásmido pBMBt1 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4, la región que comprende dichos elementos genéticos se amplificó por PCR. Adicionalmente se amplificó la región que comprende el *dso* solamente y fue utilizada como control negativo en la transformación de *B. thuringiensis*.

En la figura 9 se presentan los resultados de las diferentes amplificaciones. En los carriles 2 y 3 se muestra el fragmento amplificado de la región *dso-rep* del tamaño esperado (~ 1.1 kb). Los carriles 4 y 5 muestran el fragmento de la región del *dso*, de igual manera presenta el tamaño esperado (~ 0.25 kb). Finalmente, el carril 6 muestra el vector pHT3101?ori linearizado (~ 4.5 kb). Los fragmentos amplificados se digirieron con las enzimas de restricción *Pst*I y *Kpn*I y posteriormente se ligaron al vector pHT3101?ori previamente digerido con las mismas enzimas. Células de *E. coli* fueron transformadas por electroporación y las transformantes se analizaron por minipreparaciones. La identidad de las construcciones denominadas pHT*dso-rep* y pHT*dso* se confirmaron mediante digestión y PCR.

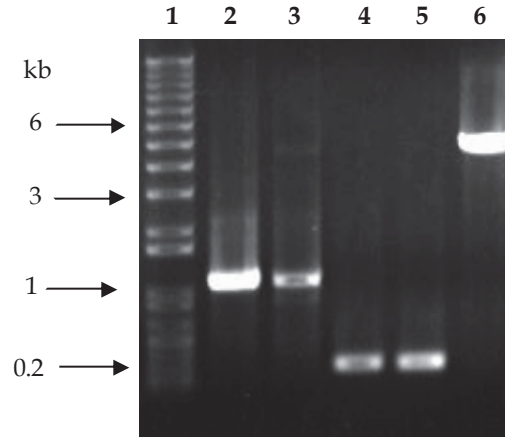


Figura 9. Amplificación por PCR de los elementos *dso-rep* y *dso* de pBMBt1 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Carriles 2 y 3) Amplificación de los elementos *dso-rep* (~ 1.1 kb). Carriles 4 y 5) Amplificación del *dso* (~ 0.25 kb). Carril 6) Vector pHT3101?ori (~ 4.5 kb).

En la figura 10 se observan las digestiones con *KpnI* del ADN obtenido de dos clones recombinantes de *E. coli*, cuyo tamaño corresponde al de las construcciones pHT*dso-rep* y pHT*dso*. En el carril 2 se observa el ADN digerido de una clona cuyo tamaño corresponde a la construcción pHT*dso-rep* (~ 5.6 kb). Por otra parte, en el carril 3 se observa el ADN digerido de una clona correspondiente a la construcción pHT*dso* (~ 4.8 kb). Finalmente, se muestra el ADN del vector pHT3101?ori utilizado como control (~ 4.5 kb) (carril 4). Debido a que no se observaron diferencias de tamaño entre el ADN de la clona que contiene la construcción pHT*dso* y el control, la clonación del *dso* fue confirmada por PCR.

Para corroborar la clonación de los elementos *dso-rep* y *dso* en el vector pHT3101?ori, el ADN de las clonas fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para estas regiones. En la figura 11 se muestran los fragmentos amplificados que corresponden al tamaño esperado de los elementos *dso-rep* (~ 1.1 kb) (carril 2) y *dso* (~ 0.25 kb) (carril 3).

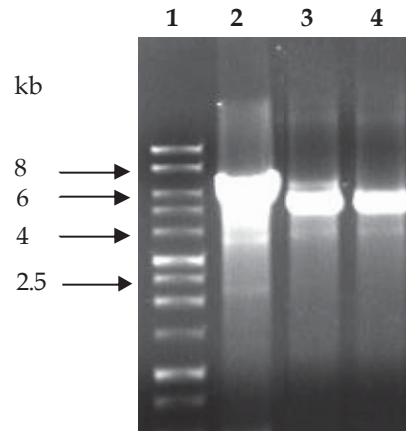


Figura 10. Digestión de ADN de clonas recombinantes que contienen las construcciones pHT*dso-rep* y pHT*dso*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb DNA ladder (Promega). Carril 2) Digestión de ADN de la clona que contiene la construcción pHT*dso-rep* (~ 5.6 kb). Carril 3) Digestión de ADN de la clona que contiene la construcción pHT*dso* (~ 4.8 kb). Carril 4) ADN del vector pHT3101?ori, que se muestra como control (~ 4.5 kb).

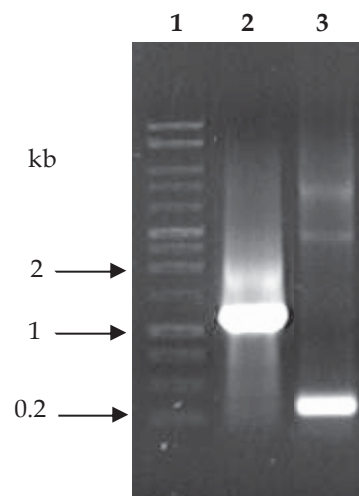


Figura 11. Amplificación por PCR de los elementos *dso-rep* y *dso* de las clonas transformantes de *E. coli*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb DNA ladder (Promega). Carril 2) Amplificación de los elementos *dso-rep* (~ 1.1 kb). Carril 3) Amplificación del *dso* (~ 0.25 kb).

Estos resultados confirmaron la clonación de los elementos *dso-rep* y *dso* en pHT3101?ori, generándose de esta manera las construcciones pHT*dso-rep* y

pHT*dso*, las cuales fueron utilizadas en los experimentos de transformación de *B. thuringiensis*.

7.3.2 Obtención de clonas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7 transformadas con el plásmido pHT*dso-rep*

Una vez obtenidas las construcciones pHT*dso-rep* y pHT*dso* y con el fin de probar sus capacidades de replicación en *B. thuringiensis*, se transformaron células de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7 (cepa acristalífera y curada de plásmidos), adicionándose 1 µg de ADN de cada una de las construcciones. Después de la transformación las células fueron distribuidas en medio LBA con eritromicina (25 µg/ml) e incubadas a 28°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, solamente se observó el crecimiento de la células que fueron transformadas con la construcción pHT*dso-rep* con una eficiencia de 1.6×10^4 UFC/µg de ADN (Figura 12A). Este resultado concuerda con la eficiencia de transformación del replicón mínimo del plásmido RC pGI3 de *B. thuringiensis*, cuyo rango se encuentra entre 10^4 y 10^5 UFC/µg de ADN (Hoflack *et al.*, 1997). Por otra parte, este resultado indica que los elementos *dso-rep* son funcionales ya que su presencia en el vector pHT3101?ori promueve su replicación en *B. thuringiensis* y por consiguiente el crecimiento de transformantes resistentes a eritromicina. Como se esperaba, no se observó la aparición de células de la cepa 4Q7 transformadas con la construcción pHT*dso*, ni de las transformadas con el vector pHT3101?ori (Figura 12B y C).

Para confirmar la presencia de los elementos *dso-rep* en las transformantes de la cepa 4Q7 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico de algunas de estas transformantes. Luego de obtener el ADN plasmídico, se realizó la amplificación por PCR de la región *dso-rep* utilizando los oligonucleótidos específicos. La figura 13 muestra el fragmento amplificado de la región *dso-rep* a partir del ADN plasmídico de dos de las transformantes de la cepa 4Q7 (carriles 2 y 3). Este resultado confirmó la presencia de los elementos *dso-rep* en dichas transformantes.

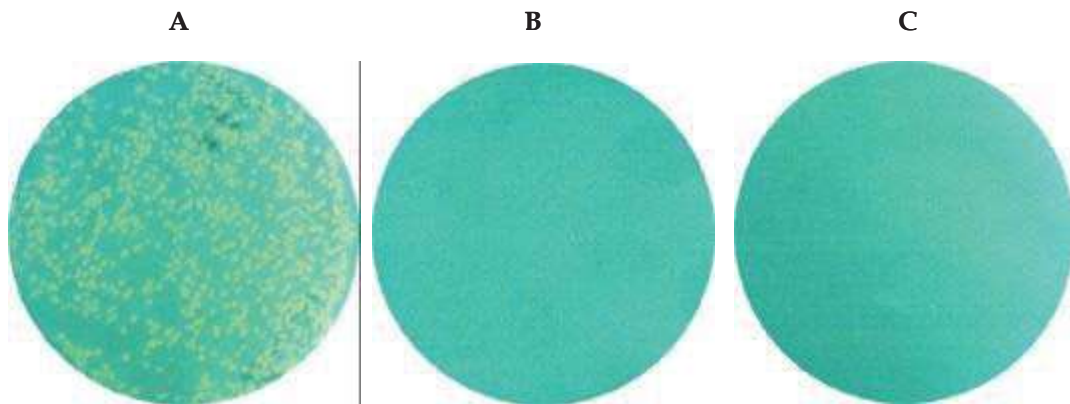


Figura 12. Obtención de células transformantes de la cepa 4Q7 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. A) Se observa la aparición de células transformadas con la construcción pHT dso -rep. En los controles negativos pHT dso (B) y pHT3101?ori (C) no se observó la aparición de células transformantes.

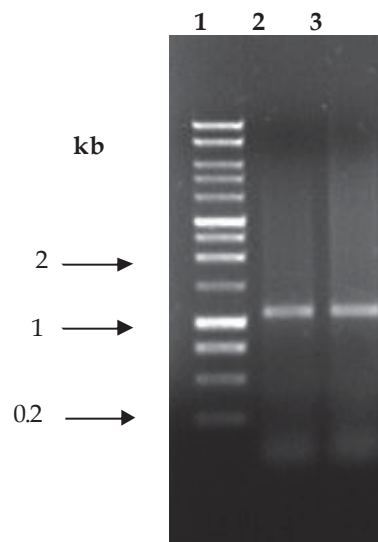


Figura 13. Amplificación por PCR de los elementos *dso-rep* de transformantes de la cepa 4Q7 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb DNA ladder (Promega). Carriles 2 y 3) Fragmento *dso-rep* amplificado (~ 1.1 kb).

8. DISCUSIÓN

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico de replicación autónoma que muestran diferentes características, entre éstas la presencia de genes que le confieren ventajas a las bacterias que los poseen. Sin embargo, no a todos los plásmidos se les ha adjudicado una función para la bacteria, ya que en algunos casos solamente se les han encontrado funciones relacionadas con la replicación y mantenimiento del plásmido en la célula bacteriana, por lo que son denominados “crípticos”. Este es el caso de los plásmidos RC caracterizados en la bacteria Gram positiva *B. thuringiensis*, de los cuales se desconoce la función que desempeñan para la bacteria (Andrup *et al.*, 2003; López-Meza, 2001).

Interesados en abordar un estudio para conocer la posible función de los plásmidos RC en *B. thuringiensis*, y con el antecedente de que la caracterización molecular de plásmidos pequeños ha permitido el diseño de vectores de clonación para esta bacteria, se llevó a cabo este trabajo de investigación cuyo objetivo general fue la caracterización de los elementos genéticos del plásmido pBMBt1 de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4.

Teniendo como antecedente la detección de los intermediarios de ADNcs en extracciones totales de plásmidos de la cepa INTA Mo14-4 provenientes del plásmido pBMBt1 (~ 7 kb) (Sánchez-Baca *et al.*, 2002), se planteó en este trabajo la confirmación de la presencia de los intermediarios de ADNcs de pBMBt1 (ya que la detección inicial se realizó solo mediante una transferencia de ADN plasmídico total en condiciones nativas) y posteriormente la determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido y el análisis de la misma.

En el primer experimento se detectaron los intermediarios de ADNcs del plásmido pBMBt1 mediante hibridación de ADN en combinación con la enzima nucleasa S1 (Figura 7, Loeza-Lara *et al.*, 2005). Este resultado confirmó la presencia de los intermediarios ADNcs, característica distintiva de los plásmidos RC (Gruss y Ehrlich, 1989) y dio además la pauta para llevar a cabo la clonación y secuenciación de pBMBt1.

De esta manera, se determinó la secuencia de nucleótidos del plásmido pBMBt1 y se estableció su organización genética. El análisis de la secuencia reveló que pBMBt1 es una molécula circular de 6700 pb y posee un contenido de GC del 32%, el cual es consistente con el porcentaje reportado para *B. thuringiensis* (Claus y Berkeley, 1986). El ADN genómico de cada organismo posee un contenido de GC particular, éste y otros parámetros (como el uso de ciertos codones) se han utilizado para determinar la adquisición de genes por transferencia horizontal (García-Vallvé *et al.*, 2000). El análisis de la secuencia reveló además que pBMBt1 presenta tres marcos de lectura abiertos (ORFs) los cuales poseen la capacidad de codificar proteínas de más de 100 aminoácidos. Asimismo, se identificaron dos secuencias con identidad a los orígenes de la replicación *dso* y *sso*, característicos de los plásmidos RC (Figura 1, Loeza-Lara *et al.*, 2005).

El ORF1 (nucleótidos 4508-5458,) codifica una proteína de 34.6 kDa que presentó identidad con la proteína CryC53 de *B. thuringiensis* subsp. *cameroun* (24.6%), la cual no posee actividad insecticida (Juárez-Pérez *et al.*, 2004); asimismo presentó identidad con la proteína Cry15Aa de *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* (21.9%), que posee actividad contra el lepidóptero *Manduca sexta* (Brown y Whiteley, 1992); finalmente, presentó identidad con las proteínas Mtx2/3 de *B. sphaericus* (27.8%), que poseen actividad mosquitocida (Thanabalu y Porter, 1996). Debido a esta identidad, la proteína fue denominada Cry14-4 (Figura 2, Loeza-Lara *et al.*, 2005). El contenido de GC del gen *cry14-4* es de 30.7%, el cual está dentro del valor determinado para *B. thuringiensis* (Claus y Berkeley, 1986). Es importante resaltar que los genes que codifican proteínas Cry insecticidas están presentes en los plásmidos grandes y conjugativos de *B. thuringiensis* (Andrup *et al.*, 2003; González *et al.*, 1982). Hasta donde sabemos, este es el primer reporte acerca de un plásmido RC (pBMBt1) de *B. thuringiensis* el cual posee un gen que codifica una proteína con identidad a proteínas Cry insecticidas.

La importancia de este resultado radica en el origen y distribución de las proteínas Cry insecticidas de *B. thuringiensis*. Respecto al posible origen del gen *cry14-4* se descartó algún evento de transposición, debido a que al analizar la

secuencia de pBMBt1 no se detectaron secuencias de inserción o transposones los cuales participan en eventos de este tipo. Una probable explicación de la presencia del gen *cry14-4* en pBMBt1 podría derivar de un evento de recombinación homóloga o ilegítima con algún plásmido conjugativo portador de genes *cry* (se descarta la participación del ADN cromosómico ya que la presencia de estos genes en el cromosoma se ha reportado como una excepción).

En apoyo de esta hipótesis, se ha observado que los intermediarios de ADNcs generados por los plásmidos RC son moléculas altamente recombinogénicas que tienen una alta capacidad de intercambiar secuencias de nucleótidos por recombinación homóloga e ilegítima (Gruss y Ehrlich, 1989). En la Figura 14 se muestra un modelo teórico mediante el cual el gen *cry14-4* podría haber sido adquirido por el plásmido pBMBt1. En este modelo se postula que este último adquirió el gen *cry14-4* por un evento de recombinación homóloga o ilegítima con algún plásmido conjugativo portador de genes *cry*, en donde el ADNcs de pBMBt1 pudo participar en eventos de recombinación.

Aunque el origen del gen *cry14-4* permanece aún desconocido, es significativo resaltar la importancia biológica de la presencia de un gen *cry* en un plásmido RC como pBMBt1. La variabilidad de proteínas Cry, así como las múltiples combinaciones de dominios de estas proteínas y su ubicuidad en las diferentes cepas de *B. thuringiensis* caracterizadas hasta la fecha, representan un reflejo de la asociación entre los genes *cry* y los elementos genéticos de recombinación (ej. secuencias de inserción y transposones) y movilización (genes *mob*) que poseen los plásmidos. En este sentido, ya que el plásmido pBMBt1 es un plásmido RC movilizable (posee el módulo de movilización *oriT-mob14-4*, ver adelante) podría contribuir a la diseminación de genes que codifican proteínas con identidad a proteínas Cry entre cepas de *B. thuringiensis*.

Finalmente, se ha observado que las proteínas Cry pueden agruparse dentro de distintos grupos de homología. La mayor parte de estos grupos conservan los llamados dominios I, II y III, importantes en la función de las proteínas Cry (Schnepf *et al.*, 1998). Sin embargo, existen otros grupos de homología minoritarios

(representados por las proteínas Cry6, Cry15 y Cry26, entre otras) que carecen de los tres dominios conservados (De Maagd *et al.*, 2001). Debido a que la proteína Cry14-4 carece de los tres dominios altamente conservados, y posee

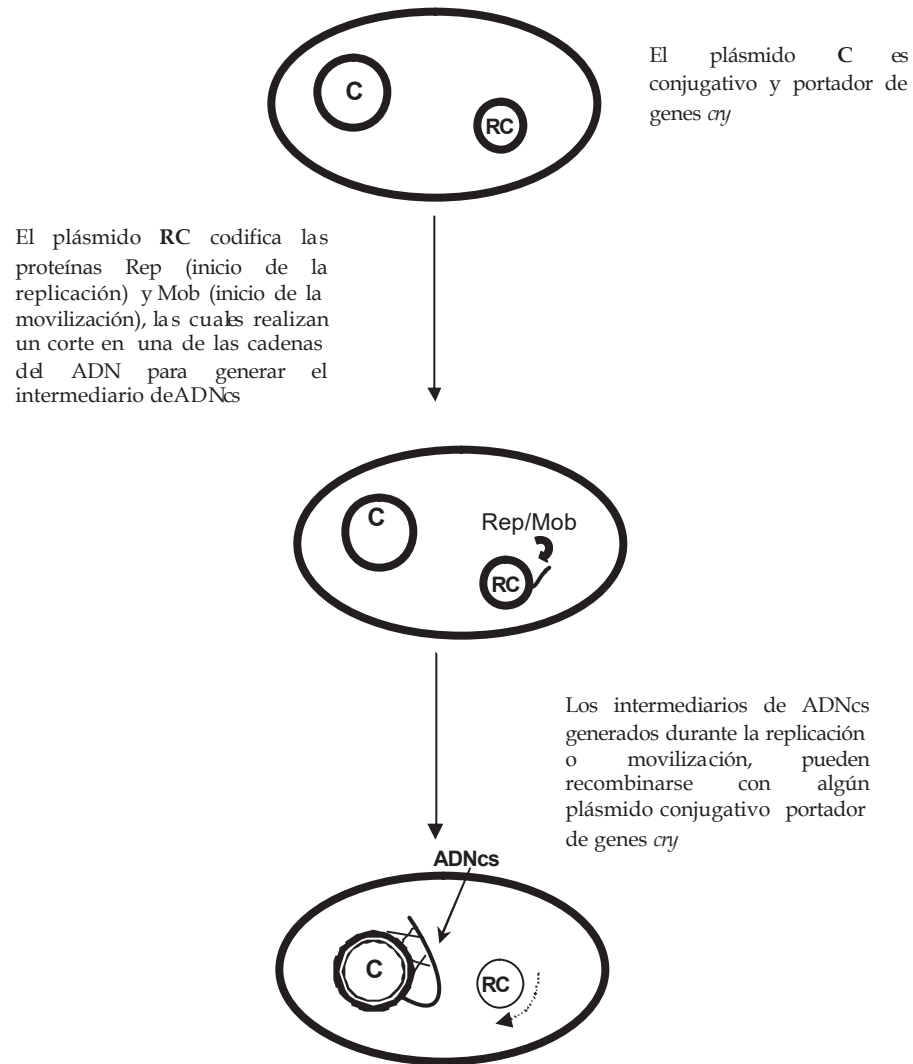


Figura 14. Modelo teórico que representa la posible adquisición, por recombinação homóloga o ilegítima, del gen *cry14-4* por parte del plásmido pBMBt1. C: plásmido conjugativo; RC: plásmido que se replica por el mecanismo del círculo rodante; Rep: proteína de replicación; Mob: proteína de movilización.

además identidad con la proteína Cry15Aa de *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni*, que también carece de los tres dominios, Cry14-4 podría formar parte de este grupo de homología minoritario.

El ORF2 (nucleótidos 1270-2604) codifica una proteína de 52.3 kDa con identidad a la proteína Mob del plásmido pUIBI-1 de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (74%) (López-Meza *et al.*, 2003) y una identidad del 64% con la proteína Mob del plásmido pBMY1 de *B. mycoides* (Di Franco *et al.*, 2000). Las proteínas Mob participan en la movilización de pequeños plásmidos entre bacterias (Andrup *et al.*, 2003). El gen *mob14-4* de pBMBt1 posee un contenido de GC 34.7%, el cual coincide con el reportado para *B. thuringiensis* (32% de GC). El módulo de movilización está formado por el gen *mob* y un sitio en *cis* denominado *oriT*, los cuales fueron detectados en pBMBt1 (Figura 3, Loeza-Lara *et al.*, 2005). Estos elementos genéticos son frecuentemente encontrados en los plásmidos RC de *B. thuringiensis* (Cuadro 1) y algunos ya han sido evaluados funcionalmente, por ejemplo, el *oriT-mob* de pTX14-3 (Andrup *et al.*, 1994) y pGI2 (Hoflack *et al.*, 1999). Debido a que, teóricamente, el módulo *oriT-mob* le permite al plásmido ser transferido a otras bacterias, lo cual tiene un impacto importante en la transferencia horizontal de información genética entre bacterias, este módulo fue evaluado funcionalmente mediante un ensayo de movilización conjugativa.

Para este ensayo se obtuvo la construcción pTH*mob14-4* que posee los elementos *oriT-mob* de pBMBt1 (ver Estrategia Metodológica) la cual fue movilizada por conjugación con una frecuencia de 9.1×10^{-6} transconjugantes/célula receptora. La obtención de transconjugantes es un resultado que demuestra la funcionalidad de los elementos *oriT-mob* del plásmido pBMBt1. Además, esto indica que pBMBt1 es un plásmido movilizable con una posible participación en la transferencia horizontal de información genética entre bacterias.

Dentro de los módulos básicos encontrados en los plásmidos RC de *B. thuringiensis*, encontramos al módulo primario formado por tres elementos estructurales, el gen *rep* y los orígenes de replicación *dso* y *ssu*. A continuación se

discutirá cada uno de estos elementos estructurales identificados en el plásmido pBMBt1.

El ORF3 (nucleótidos 3591-2992) de pBMBt1 codifica la proteína Rep (23.6 kDa) y presentó identidad (37.6%) con la proteína Rep del plásmido pBMYdx de *B. mycoides* (Di Franco *et al.*, 2000) (Figura 4, Loeza-Lara *et al.*, 2005). El gen *rep14-4* mostró un contenido de GC de 24.1%. Este resultado muestra una diferencia notoria respecto al contenido de GC de *B. thuringiensis*, por lo que probablemente este gen pudo haber sido obtenido por transferencia horizontal de alguna bacteria no relacionada directamente. Las proteínas Rep de otros plásmidos RC, que han sido estudiadas con mayor detalle, poseen diversos motivos y residuos altamente conservados (Ilyna y Koonin, 1992). Algunos de éstos han sido evaluados experimentalmente y se ha demostrado que son importantes para la función de la proteína (Dempsey *et al.*, 1992). Dentro de estos residuos el más importante es el residuo de tirosina (tirosina 191 en pT181 de *S. aureus*, tirosina 214 en pC194 de *S. aureus*) el cual es el encargado de realizar el corte en el *dso* y la unión posterior al ADN. Debido a la falta de identidad que tienen las proteínas Rep de pBMBt1 y de pBMYdx con otras proteínas Rep, y ante la falta de información experimental, no se identificó de manera teórica algún motivo o residuo esencial en la función de la proteína Rep de pBMBt1.

Por otra parte, con base en la identidad de las proteínas Rep de plásmidos RC, se han establecido actualmente 17 grupos de plásmidos (http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR/DPR_RCRdata.htm). La falta de identidad de las proteínas Rep de los plásmidos pBMBt1 y pBMYdx con las de otros plásmidos RC, sugiere que ambos plásmidos podrían constituir un nuevo grupo de plásmidos RC.

Otro de los elementos importantes del módulo primario y esencial para la replicación RC es el sitio *dso*. Como se ha mencionado, la proteína Rep se une al sitio *dso* al inicio de la replicación y elabora un corte específico con lo que se inicia el proceso. El sitio *dso* de pBMBt1 fue localizado hacia el extremo 5' del gen *rep* y mostró la mayor identidad con los sitios *dso* de los plásmidos pUIBI-1 de *B.*

thuringiensis subsp. *entomocidus* (81.4%) (López-Meza *et al.*, 2003) y pBMY1 de *B. mycoides* (81.1%) (Di Franco *et al.*, 2000) (Figura 5, Loeza-Lara *et al.*, 2005). Aunque este resultado relaciona a pBMBt1 con el grupo VII de plásmidos RC, al considerar como criterio de agrupamiento sólo la secuencia de aminoácidos de la proteína Rep, pBMBt1 y pBMYdx podrían constituir una nueva familia de plásmidos RC.

Luego de localizar los elementos *dso-rep* involucrados en la replicación de pBMBt1, éstos fueron evaluados funcionalmente mediante el diseño de las construcciones pHT*dso-rep* y pHT*dso* (ver Estrategia Metodológica). La obtención de transformantes con la construcción pHT*dso-rep* (Figura 12A), demostró la funcionalidad de los elementos *dso-rep*, ya que éstos fueron indispensables para que el vector pHT3101?ori se replicara en *B. thuringiensis*. La importancia de este resultado radica en el hecho de que se demostró que los elementos *dso-rep*, detectados de manera teórica en pBMBt1, son funcionales, además de que se obtuvo una construcción que podría utilizarse como base para el diseño de un vector de clonación para *B. thuringiensis*.

El último de los elementos del módulo primario es el sitio *sso*. Este elemento representa una señal involucrada en la síntesis de la cadena retrasada, la cual es reconocida exclusivamente por las proteínas del hospedero. El *sso* tiene la capacidad de formar hasta cuatro estructuras secundarias tipo tallo asa (Kramer *et al.*, 1995). Luego de realizar la búsqueda de secuencias repetidas invertidas, que pudieran formar estas estructuras secundarias, en la secuencia de pBMBt1, se encontró una región con estas características (nucleótidos 937-1098). Adicionalmente, esta región mostró 40.4% de identidad con el *ssoA* del plásmido pC194 (Horinouchi y Weisblum, 1982) y 41% con el *ssoA* de pBMSa1 de *S. aureus* (Loeza-Lara *et al.*, 2004). Este resultado sugiere que el *sso* de pBMBt1 pertenece al tipo A. Finalmente, se realizó la predicción de la estructura secundaria del *ssoA* de pBMBt1 (nucleótidos 937-1098). La estructura formada por el *ssoA* de pBMBt1 (Figura 15A) posee un ΔG de -45 kcal/mol, lo que indica que es una estructura estable similar a la formada por el *ssoA* de pE194 de *S. aureus* (Figura 15B). Aunque la región delimitada como el sitio *sso* no ha sido evaluada experimentalmente,

estos resultados sugieren que en esta región se encuentra el *sso* de pBMBt1 (Figura 6, Loeza-Lara *et al.*, 2005).

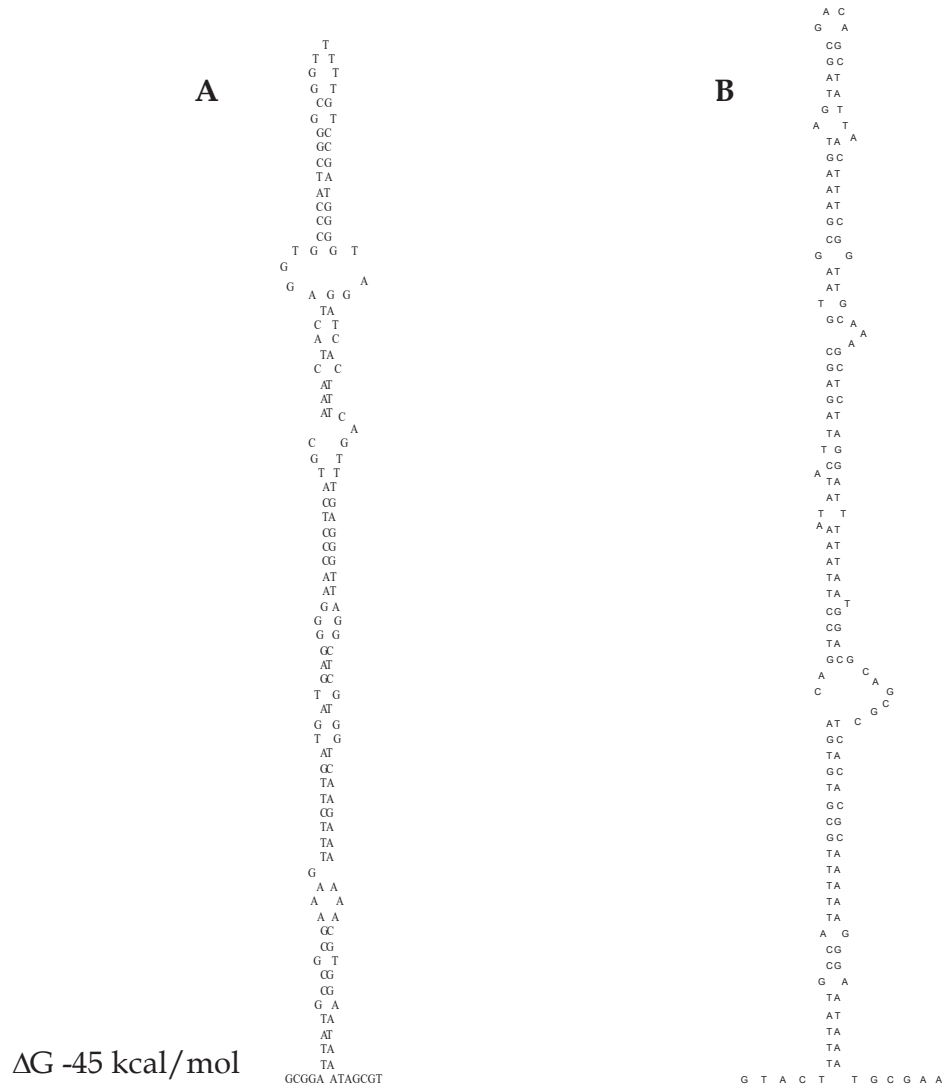


Figura 15. Estructura secundaria formada por el *ssoA* de pBMBt1. A) *ssoA* del plásmido pBMBt1. ΔG = Energía libre. B) *ssoA* del plásmido pE194 de *S. aureus*.

Finalmente, el origen de replicación de un plásmido permite el establecimiento de la molécula en la célula. Además, los plásmidos pueden portar una o más secuencias codificantes que favorecen su adaptación al nicho molecular bacteriano asegurando su replicación y mantenimiento en la célula. Para mantener

este ambiente, los plásmidos pueden “secuestrar” nuevos genes durante eventos de transferencia horizontal como resultado de las presiones de selección a las que se someten (Kado, 1998). El estudio de los plásmidos RC ha mostrado que tienen un carácter modular, por ejemplo, un plásmido puede contener el gen de resistencia a antibióticos de un plásmido A y la región de replicación de un plásmido B. El plásmido pBMBt1 no es la excepción ya que presentó una estructura modular. pBMBt1 codifica una proteína Rep con identidad a Rep de pBMYdx de *B. mycooides*; un *dso* similar al de pUIBI-1 de *B. thuringiensis*; un *ssoA* con identidad al *sso* pBMSa1 de *S. aureus*; además de una proteína Mob con identidad a la de pUIBI-1 de *B. thuringiensis* y pBMY1 de *B. mycooides*. Finalmente, codifica una proteína con identidad a proteínas Cry y Mtx de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus*. Estos resultados confirman la naturaleza modular de los plásmidos RC.

9. CONCLUSIÓN

El plásmido pBMBt1 de es un nuevo plásmido de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* INTA Mo14-4 que se replica por el mecanismo del círculo rodante, como lo indica la detección de intermediarios de ADNcs y la identificación de los elementos esenciales para la replicación de los plásmidos RC (*rep*, *dso* y *sso*), el cual podría formar parte de un nuevo grupo de plásmidos RC. Adicionalmente, pBMBt1 es un plásmido movilizable que codifica la proteína Cry14-4 con identidad a proteínas Cry insecticidas de *B. thuringiensis*. Este es el primer reporte de un plásmido RC de *B. thuringiensis* que porta un gen de este tipo. Finalmente, se demostró que los elementos *dso-rep* son funcionales.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Andrup, L., Damgaard, J., Wassermann, K., Boe, L., Madsen, S.M., Hansen, F., 1994. Complete nucleotide sequence of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid pTX14-3 and its correlation with biological properties. *Plasmid* 31, 72-88.
- Andrup, L., Jensen, G.B., Wilcks, A., Smidt, L., Hoflack, L., Mahillon, J., 2003. The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmids from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. *Plasmid* 49, 205-232.
- Aronson, A., 2002. Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol. Life. Sci.* 59, 417-425.
- Barloy, F., Lecadet, M.M., Delecluse, A., 1998. Distribution of clostridial *cry*-like genes among *Bacillus thuringiensis* and *Clostridium* strains. *Curr. Microbiol.* 36, 232-237.
- Benintende, G.B., López-Meza, J.E., Cozzi, J.G., Ibarra, J.E., 1999. Novel non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 151-155.
- Boe, L., Gros, M.F., te Riele, H., Ehrlich, S.D., Gruss, A., 1989. Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110. *J. Bacteriol.* 171, 3366-3372.
- Brehm, J.K., Pennock, A., Bullman, H.M.S., Young, M., Oultram, J.D., Minton, N.P., 1992. Physical characterization of the replication origin of the cryptic plasmid pCB101 isolated from *Clostridium butyricum* NCIB 7423. *Plasmid* 28, 1-13.
- Brown, K.L., Whiteley, H.R., 1992. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. *J. Bacteriol.* 174, 549-557.
- Campos-Olivas, R., Louis, J.M., Clerot, D., Gronenborn, B., Gronenborn, A.M., 2002. The structure of a replication initiator unites diverse aspects of nucleic acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 10310-10315.
- Casali, N., Preston, A., 2003. *Escherichia coli* plasmid vectors. Human Press. Totowa, New Jersey., pp 316.

- Chang, T.L., Kramer, M.G., Ansari, R.A., Khan, S.A., 2000. Role of individual monomers of a dimeric initiator protein in the initiation and termination of plasmid rolling-circle replication. *J. Biol. Chem.* 275, 13529-13534.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W., 1986. *Genus Bacillus*. Cohn. 1978, 144AL. In: Sneath, P.H.A., Mair, M.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1105-1135.
- Crickmore, N., Zeigler, R.D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, H.D., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Rev.* 6, 807-813.
- Del Solar, G., Alonso, J.C., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R., 1996. Broad-host-range plasmid replication: an open question. *Mol. Microbiol.* 21, 661-666.
- Del Solar, G., Diaz, R., Espinosa, M., 1987. Replication of the streptococcal plasmid pMV158 and derivatives in cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 206, 428-435.
- Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echeverría, M., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434-464.
- Del Solar, G., Moscoso, M., Espinosa, M., 1993. Rolling circle-replication plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria: a wall falls. *Mol. Microbiol.* 8, 789-796.
- De Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, E., 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37, 409-433.
- De Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193-199.
- Dempsey, L.A., Birch, P., Khan, S.A., 1992. Uncoupling of the DNA topoisomerase and replication activities of an initiator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 3083-3087.

- Devine, K., Hogan, S., Higgins, D., McConnell, D., 1989. Replication and segregational stability of the *Bacillus* plasmid pBAA1. *J. Bacteriol.* 171, 1166-1172.
- Di Franco, D., Pisaneschi, G., Beccari, E., 2000. Molecular analysis of two rolling-circle replicating cryptic plasmids, pBMYdx and pBMY1, from the soil Gram-positive *Bacillus mycoides*. *Plasmid* 44, 280-284.
- Erauso, G., Marsin, S., Benbouzid-Rollet, N., Baucher, M.-F., Barbeyron, T., Zivanovic, Y., Prieur, D., Forterre, P. 1996. Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon *Pyrococcus abyssi*: evidence for rolling-circle replication in a hypertermophile. *J. Bacteriol.* 178, 3232-3237.
- Fernández-González, C., Cadenas, R.F., Noirot-Gross, F., Martin, J.F., Gil, J.A. 1994. Characterization of a region of plasmid pBL1 of *Brevibacterium lactofermentum* involved in replication via the rolling-circle model. *J. Bacteriol.* 176, 3154-3161.
- Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.A., Latorre, A., Drainas, C., De la Cruz, F., 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 79-100.
- Franco-Rivera, A., Benintende, G., Cozzi, J., Baizabal-Aguirre, V.M., Valdez-Alarcón, J.J., López-Meza, J.E., 2004. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 87-92.
- Funnel, B.E., Phillips, G.J., 2004. *Plasmid Biology*. American Society for Microbiology. Washington, D.C., pp 614.
- Garcia-Vallvé, S., Romeu, A., Palau, J., 2000. Horizontal transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res.* 10, 1719-1725.
- Galli, D.M., Leblanc, D.J., 1995. Transcriptional analysis of rolling-circle replicating plasmid pVT736-1: evidence for replication control by antisense RNA. *J. Bacteriol.* 177, 4474-4480.
- González, J.M., Brown, B.J., Carlton, B.C., 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 6951-6955.

- Gruss, A., Ehrlich, S.D., 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* 53, 231-241.
- Gruss, A., Ross, H.F., Novick, R.P., 1987. Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 2165-2169.
- Guzmán, L.M., Espinosa, M., 1997. The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J. Mol. Biol.* 266, 688-702.
- Hoflack, L., Seurinck, J., Mahillon, J., 1997. Nucleotide sequence and characterization of the cryptic *Bacillus thuringiensis* plasmid pGI3 reveal a new family of rolling circle replicons. *J. Bacteriol.* 179, 5000-5008.
- Hoflack, L., Wilcks, A., Andrup, L., Mahillon, J., 1999. Functional insight into pGI2, a cryptic rolling-circle replicating plasmid from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology* 145, 1519-1530.
- Holwick, R., Wallbrunn, V.A., Keweloh, H., Meinhardt, F., 2001. A novel rolling-circle replication plasmid from *Pseudomonas putida* P8: Molecular characterization and use as vector. *Microbiology* 147, 337-344.
- Horinouchi, S., Weisblum, B., 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* 150, 815-825.
- Hu, X., Hansen, B., Eilenberg, J., Hendriksen, N., Smidt, L., Yuan, Z., Jensen, G., 2004. Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a *cry1Ac* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 45-52.
- Ilyna, T.V., Koonin, E.V., 1992. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eukaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res.* 20, 3279-3285.
- Iordanescu, S., 1989. Specificity of the interaction between the Rep proteins and the origin of replication of *Staphylococcus aureus* plasmids pT181 and pC221. *Mol. Gen. Genet.* 217, 481-487.

- Iordanescu, S., 1993. Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* chromosomal gene *pcrA*, identified by mutations affecting plasmid pT181 replication. *Mol. Gen. Genet.* 241, 185-192.
- Janni re, L., Ehrlich, D., 1987. Recombination between short repeated sequences is more frequent in plasmids than in the chromosome of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 210, 116-121.
- Janni re, L., Gruss, A., Ehrlich, D., 1993. Plasmids. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (Eds.), *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 625-644.
- Juárez-Pérez, V.M., Jacquemard, P., Frutos, R., 1994. Characterization of the type strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *cameroun* serotype H32. *FEMS Microbiol. Lett.* 122, 43-48.
- Kado, I. C., 1998. Origin and evolution of plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 117-126.
- Khan, S.A., 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 442-455.
- Khan, S.A., 2004. Rolling-circle replication. In: Funnel B.E., Phillips, G.J. (Eds). *Plasmid Biology*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 63-78.
- Khan, S.A., 2005. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* 53, 126-136.
- Khan, S.A., Murray, R.W., Koepsel, R.R., 1988. Mechanism of plasmid pT181 DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta* 951, 375-381.
- Khan, S.A., Novick, R.P., 1983. Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 10, 251-259.
- King, K.W., Dybvig, K., 1992. Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* plasmid pKMK1. *Plasmid* 28, 86-91.
- Koepsel, R.R., Khan, S.A., 1986. Static and initiator protein-enhanced bending of DNA at a replication origin. *Science* 233, 1316-1318.

- Koepsel, R.R., Murray, R.W., Khan, S.A., 1986. Sequence-specific interaction between the replication initiator protein of plasmid pT181 and its origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 5484-5488.
- Koepsel, R.R., Murray, R.W., Rosenblum, W.D., Khan, S.A., 1985a. Purification of pT181-encoded RepC protein required for the initiation of plasmid replication. *J. Biol. Chem.* 260, 8571-8577.
- Koepsel, R.R., Murray, R.W., Rosenblum, W.D., Khan, S.A., 1985b. The replication initiator protein of plasmid pT181 has sequence-specific endonuclease and topoisomerase-like activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 6845-6849.
- Kramer, M.G., Del Solar, G., Espinosa, M., 1995. Lagging-strand origins of the promiscuous plasmid pMV158: physical and functional characterization. *Microbiology* 141, 655-662.
- Kramer, M.G., Espinosa, M., Misra, T.K., Khan, S.A., 1999. Characterization of a single-strand origin, *ssoU*, required for broad host range replication of rolling-circle plasmids. *Mol. Microbiol.* 33, 466-475.
- Kramer, M.G., Khan, S.A., Espinosa, M., 1997. Plasmid rolling circle replication: Identification of the RNA polymerase-directed primer RNA and requirement of DNA polymerase I for lagging strand synthesis. *EMBO J.* 16, 5784-5795.
- Kramer, M.G., Khan, S.A., Espinosa, M., 1998. Lagging-strand replication from the *ssoA* origin of plasmid pMV158 in *Streptococcus pneumoniae*: in vivo and in vitro influences of mutations in two conserved *ssoA* regions. *J. Bacteriol.* 180, 83-89.
- Leer, R.J., van Luijk, N., Posno, M., Pouwels, P.H., 1992. Structural and functional analysis at two cryptic plasmids from *Lactobacillus pentosus* MD353 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Mol. Gen. Genet.* 234, 265-274.
- Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., Lecadet, M.M., 1989. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 211-218.

- Loeza-Lara, P.D., Benintende, G.B., Cozzi, J.G., Ochoa-Zarzosa, A., Baizabal-Aguirre, V.M., Valdez-Alarcón, J.J., López-Meza, J.E., 2005. The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. *Plasmid* 54, 229-240.
- Loeza-Lara, P.D., Soto-Huipe, M., Baizabal-Aguirre, V.M., Ochoa-Zarzosa, A., Valdez-Alarcón, J.J., Cano-Camacho, H., López-Meza, J.E., 2004. pBMSa1 a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus* encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling circle mechanism. *Plasmid* 52, 48-56.
- Loeza-Lara, P.D., Valdez-Alarcón, J.J., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E., 2004. Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. *REB* 23, 79-86.
- López-Meza, J.E., 2001. Biología molecular de los plásmidos RC y su función en *Bacillus thuringiensis*. *Ciencia Nicolaita* 29, 23-30.
- López-Meza, J.E., Barboza-Corona, J.E., del Rincón-Castro, C., Ibarra, J.E., 2003. Sequencing and characterization of plasmid pUIB1 from *Bacillus thuringiensis* serovar *entomocidus* LBIT-113. *Curr. Microbiol.* 47, 395-399.
- López-Meza, J.E., Federici, B.A., Poehner, W.J., Martínez-Castillo, A., Ibarra, J.E., 1995. Highly mosquitocidal isolates of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae* and *entomocidus* from Mexico. *Biochem. Syst. Ecol.* 23, 461-468.
- Lu, Q., 2004. Plasmid vectors for gene cloning and expression. *In: Funnel B.E., Phillips, G.J. (Eds). Plasmid Biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C., pp 545-566.*
- Mahillon, J., Seurinck, J., 1988. Complete nucleotide sequence of pGI2 a *Bacillus thuringiensis* plasmid containing *Tn4430*. *Nucleic Acids Res.* 16, 11827-11829.
- Marin, R., Tanguay, R.M., Valero, J., Letarte, R., Bellemare, G., 1992. Isolation and sequence of a 2-kbp miniplasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-3a3b: relationship with miniplasmids of other *Bacillus thuringiensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 73, 263-269.

- McDowell, D.G., Mann, N.H., 1991. Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1-DIPEL. *Plasmid* 25, 113-120.
- McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T., Sueoka, N., 1986. The nucleotide sequence of pUB110: Some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* 15, 93-103.
- Mesrati, L.A., Karray, M.D., Tounsi, S., Jaoua, S., 2005. Construction of a new high-copy number shuttle vector of *Bacillus thuringiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 361-366.
- Noirot, P., Bargonetti, J., Novick, R.P., 1990. Initiation of rolling-circle replication in pT181 plasmid: Initiator protein enhances cruciform extrusion at the origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 8560-8564.
- Novick, R.P., 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 537-565.
- Pouwels, P.H., Leer, R.J., 1993. Genetics of *Lactobacilli*: plasmids and expression. *Antonie van Leeuwenhoek* 64, 85-107.
- Rasooly, A., Novick, R.P., 1993. Replication-specific inactivation of the pT181 plasmid initiator protein. *Science* 262, 1048-1050.
- Rasooly, A., Rasooly, S.R., 1997. How rolling circle plasmids control their copy number. *Trends Microbiol.* 11, 440-446.
- Sánchez-Baca, A.D., Alfaro, H.Y., Benintende, G.B., Valdez-Alarcón, J.J., López-Meza, J.E., 2002. Identificación de plásmidos RC en cepas de *Bacillus thuringiensis*. *Memorias del X Simposio de la Investigación y el Desarrollo Tecnológico en Michoacán*, pp 46.
- Sánchez, C., Mayo, B., 2004. General and specialized vectors derived from pBM02, a new rolling circle replicating plasmid of *Lactococcus lactis*. *Plasmid* 51, 265-271.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467.

- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806.
- Seegers, J.F. M.L., Zhao, A., Meijer, W.J.J., Khan, S.A., Venema, G., Bron, S., 1995. Structural and functional analysis of the single-strand origin of replication from the lactococcal plasmid pWV01. *Mol. Gen. Genet.* 249, 43-50.
- Seery, L., Devine, K.M., 1993. Analysis of features contributing to activity of the single-stranded origin of *Bacillus* plasmid pBAA1. *J. Bacteriol.* 175, 1988-1994.
- Snyder, L., Champness, W., 2003. *Molecular Genetics of Bacteria*. American Society for Microbiology. Washington, D.C., pp 157-185.
- Stemmer, W.P.C., 1991. A 20-minute ethidium bromide/high salt extraction protocol for plasmid DNA. *Biotechniques* 10, 726.
- Te Riele, H., Michel, B., Ehrlich, S.D., 1986. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 2541-2545.
- Thanabalu, T., Porter, A.G., 1996. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. *Gene* 170, 85-89.
- Van der Lelie, D., Bron, S., Venema, G., Oskam, L., 1989. Similarity of minus origins of replication and flanking open reading frames of plasmids pUB110, pTB913 and pMV158. *Nucleic Acids Res.* 17, 7283-7294.
- Venkova-Canova, T., Miroslav, P., Nesvera, J., 2004. Characterization of the cryptic plasmid pCC1 from *Corynebacterium callunae* and its use for vector construction. *Plasmid* 51, 54-60.
- Wang, P.Z., Projan, S.J., Henriquez, V., Novick, R.P., 1992. Specificity of origin recognition by replication initiator protein in plasmids of the pT181 family is determined by a six amino acid residue element. *J. Mol. Biol.* 223, 145-158.
- Wilcks, A., Jayaswal, N., Lereclus, D., Andrup, L., 1998. Characterization of plasmid pAW63, a second self-transmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD73. *Microbiology* 144, 1263-1270.

- Yasukawa, H., Hase, T., Sakai, A., Masamune, Y., 1991. Rolling-circle replication of the plasmid pKYM isolated from a Gram-negative bacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 10282-10286.
- Zhang, J.B., Hodgman, T.C., Krieger, L., Schnetter, W., Schairer, H.U., 1997. Cloning and analysis of the first *cry* gene from *Bacillus popilliae*. J. Bacteriol. 179, 4336-4341.
- Zhao, A.C., Khan, S.A., 1997. Sequence requirements for the termination of rolling-circle replication of plasmid pT181. Mol. Microbiol. 24, 535-544.

11. ANEXOS (PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TRABAJO DE TESIS)

- **Loeza-Lara, P.D.,** M. Soto-Huipe, V.M. Baizabal-Aguirre, A. Ochoa-Zarzosa, J.J. Valdez-Alarcón, H. Cano-Camacho and J.E. López-Meza. 2004. pBMSa1 a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus* encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling circle mechanism. *Plasmid*, 52(1): 48-56.
- **Loeza-Lara, P.D,** V.M. Baizabal-Aguirre, J.J. Valdez-Alarcón y J.E. López-Meza. 2004. Mecanismos de replicación de plásmidos en bacterias. *Revista de Educación Bioquímica*, 23 (2): 79-86.



pBMSa1, a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus*, encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling-circle mechanism

Pedro D. Loeza-Lara, Morelia Soto-Huipe, Victor M. Baizabal-Aguirre, Alejandra Ochoa-Zarzosa, Juan J. Valdez-Alarcón, Horacio Cano-Camacho, and Joel E. López-Meza*

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Apdo. Postal 53, Administración Chapultepec, C.P. 58262 Morelia, Michoacán, Mexico

Received 8 March 2004, revised 27 March 2004

Available online 24 April 2004

Abstract

This work describes a novel plasmid encoding resistance to lincomycin in a staphylococcal isolate associated with mastitis infection from dairy cows. The cryptic plasmid pBMSa1 (2750 bp) of *Staphylococcus aureus* SA35 was subcloned and sequenced. Two ORFs (ORF1 and ORF2) were identified, and their putative transcription initiation and Shine–Dalgarno sequence were localized. ORF1 encodes a 334-residue protein almost identical to the putative Rep proteins of previously sequenced *S. aureus* rolling-circle-replicating plasmids. ORF2 encodes a 162-amino acid protein sharing a high degree of homology with LinA proteins (lincosamide *O*-nucleotidyltransferases) described in a variety of *S. aureus* strains. Intracellular single-stranded pBMSa1 DNA replicating intermediaries were detected, suggesting replication via the rolling-circle mechanism. A putative double-strand origin with significant homology to that of pC194 and a *ssoA*-type single-strand origin homologous sequence were also identified.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Dairy cow; Rolling-circle replication; RCR plasmid; Lincomycin

Staphylococcus aureus is a Gram-positive bacterium responsible for various major diseases in both humans and domestic animals. In dairy ani-

mals, *S. aureus* is one of the major causes of intramammary infections (mastitis) of lactating females, and it is frequently isolated from milk. The presence of this bacterium in raw milk represents a risk for human health and causes serious economic losses to milk producers around the world (Sutra and Poutrel, 1994).

* Corresponding author. Fax: 52-443-295-8029.

E-mail address: elmeza@zeus.umich.mx (J.E. López-Meza).

Worldwide, the increasing prevalence of multi-resistant *S. aureus* strains has become an additional problem (Ayliffe, 1997; Kreiswirth et al., 1993). Clinical isolates of *S. aureus* often harbor multiple plasmids, ranging from small rolling-circle (RCR) replicating plasmids that are cryptic or encode a single resistance determinant, to larger multiresistance and conjugative plasmids (Firth and Skurray, 2000; Novick, 1989; Weigel et al., 2003). Increased attention has been focused on plasmid-encoded resistance to antiseptics and disinfectants in antibiotic-resistant staphylococci (Bjorland et al., 2003; Littlejohn et al., 1992; Russell, 1997). Staphylococcal infections are frequently treated with macrolides, lincosamides, and streptogramin (MLS) antibiotics. Resistance to macrolides (such as erythromycin) and lincosamides (such as lincomycin and clindamycin) is prevalent among staphylococci (Kreiswirth et al., 1993; Lina et al., 1999). A number of genes conferring resistance to these antibiotics have been identified as well as their corresponding mechanisms in staphylococci strains. Three related determinants, *ermA*, *ermB*, and *ermC*, have been characterized which confer resistance to MLS type B (MLS_B) antibiotics by target site alteration of the ribosome (Leclercq and Courvalin, 1991; Lina et al., 1999). Lincomycin is naturally produced by several actinomycetes, whereas clindamycin belongs to a semisynthetic class of antibiotic obtained by the chlorination of lincomycin. These antibiotics are active against many Gram-positive cocci and anaerobes; they inhibit protein synthesis by blocking the peptidyltransferase activity of the 50S subunit of the bacterial ribosome. The *linA* and *linA'* genes from pIP856 (*Staphylococcus haemolyticus*) and pIP855 (*S. aureus*) plasmids, respectively, encode lincosamide *O*-nucleotidyltransferases isoenzymes that differ by 14 amino acids and exclusively confer resistance to lincosamides (Brisson-Noël and Courvalin, 1986; Brisson-Noël et al., 1988). The distribution of *linA* and *linA'* genes were studied by DNA–DNA hybridization, and related sequences were found in strains belonging to various species of staphylococci (Leclercq et al., 1987). Another gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides was found in *Enterococcus faecium* HM1025 (Bozdogan et al.,

1999). Also, several bovine lincomycin-resistant *S. chromogenes* strains were found to carry the *linA* gene (Devriese et al., 2002).

Although several *linA* genes have been identified in bovine isolates of *Staphylococcus* sp., only limited information is available on the structure and organization of the plasmids in which they are harbored. This paper reports the sequence and genetic characterization of pBMSa1, a 2.75-kb plasmid from a lincomycin resistant *S. aureus* isolated from a cow with subclinical mastitis at a dairy region located in Morelia, Michoacán, México.

Twenty *S. aureus* isolates were collected from milk samples from 20 cows with subclinical mastitis from 9 different farms in Morelia, Michoacán, México. *S. aureus* were identified with standard biotypification tests, including hemolysis, the coagulase test, and also by ribotyping. *S. aureus* cells were grown at 37 °C in Luria–Bertani (LB, Difco) and Mueller–Hinton (MH) broths (Bioxon, México). *Escherichia coli* strain XL1-Blue (Stratagene), used as a host for the recombinant plasmids, was cultivated in LB at 37 °C. When used as agar plates, all media were solidified with 1.5% agar (Difco).

All 20 *S. aureus* isolates were tested for antimicrobial sensitivity and quaternary ammonium compounds (QAC) susceptibility. Antimicrobial sensitivity was determined for 13 antibiotics by the disk diffusion method on MH agar plates. The following disks were used (Bio-Rad): ampicillin, 10 µg; cefalotin, 30 µg; cefotaxime, 30 µg; ceftazidime, 30 µg; cefuroxime, 30 µg; dicloxacillin, 1 µg; erythromycin, 15 µg; gentamicin, 10 µg; pefloxacin, 5 µg; penicillin, 10 U; tetracycline, 30 µg; trimethoprim, 25 µg; and lincomycin, 10 µg/ml (Pharmacia). Isolates were classified as susceptible, intermediate and resistant according to the manufacturer's instructions. Susceptibility to QAC was tested on MH agar plates containing different concentrations of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ranging from 1 to 10 µg/ml. A control MH agar plate without drug was used as a control for each isolate. Plates were incubated at 37 °C for 24 h. Isolates with confluent or semi-confluent growth on MH agar containing CTAB at 6.0 µg/ml were considered resistant.

Plasmid DNA isolation of the *S. aureus* SA35 isolate was carried out by using a modified procedure of the alkaline lysis method (Birnboim and Doly, 1979). The purified plasmid pBMSa1 was linearized with *EcoRI* and ligated into the pBluescript II KS (+) (*EcoRI*) vector (Stratagene) and then transformed into competent *E. coli* XL1-Blue cells (Sambrook and Russell, 2001). The nucleotide sequence of pBMSa1 was determined for both strands by the dideoxy-chain termination method (Sanger et al., 1977) using synthetic oligonucleotide primers and a BigDye terminator sequencing kit v 3.1 (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions and an automated ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Sequencer (Perkin-Elmer). Nucleotide sequences of pBMSa1 were analyzed with the DNAsis 2.0 (Hitachi) and Clustal V program of the MegAlign analysis software (DNASTar) and the National Center for Biotechnology Information BLASTN server (Altschul et al., 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

To detect ssDNA intermediates, the total plasmid DNA of the *S. aureus* SA35 isolate 100 μ l (ca. 2 μ g) was digested with 100 U of the ssDNA specific S1 nuclease (Invitrogen) in 11 μ l of 10 \times S1 buffer. The reaction mixture was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 20 min. Digested and non-digested samples were electrophoresed in 1% agarose gels and plasmids were transferred to Nylon membranes (NYTRAN), under denaturing as well as non-denaturing conditions, as described previously (López-Meza et al., 2003). The 2.75 kb *EcoRI* fragment of plasmid pBMSa1 was labeled with digoxigenin (Roche) and used as a probe. Hybridization was performed in 5 \times SSC at 65 $^{\circ}$ C overnight. Membranes were washed twice at room temperature in 2 \times SSC, 0.1% SDS; and twice at 65 $^{\circ}$ C in 0.5 \times SSC, 0.1% SDS, 15 min each. Membranes were exposed to Kodak X-Omat XAR-5 films.

According to the initial screening, the 20 *S. aureus* isolates collected from 20 different cows in the region of Morelia, México, were susceptible to 1 μ g/ml CTAB. All cows sampled were from backyard farms where the application of disinfectant elaborated with QACs is not a common practice. Thus, the absence of a selection pressure

could explain the lack of resistance to CTAB. The 20 *S. aureus* isolates were tested for sensitivity against different antibiotics by the disk diffusion assay. In general, a variable sensitivity behavior was detected towards the antibiotics tested, while all isolates showed moderate resistance to ceftazidime, penicillin, ampicillin, and dicloxacillin. They were highly sensitive to trimethoprim, cefotaxime, cefalotin, and erythromycin. Interestingly, only one isolate, *S. aureus* SA35, was resistant to the antibiotic lincomycin at concentrations greater than 10 μ g/ml. Therefore, the resistance determinant to this antibiotic was identified and characterized in the pBMSa1 plasmid.

The native pBMSa1 staphylococcal plasmid was subjected to restriction endonuclease analysis that showed single sites for *EcoRI* and *ClaI*. To obtain the complete nucleotide sequence, plasmid pBMSa1 was subcloned into the *E. coli* plasmid pBluescript II KS (+), at the unique *EcoRI* site. The size of pBMSa1 determined was 2750 bp and the sequence has been deposited in the GenBank database (Accession No. AY541446).

The deduced physical and genetic map of pBMSa1 is shown in Fig. 1. The G + C content of

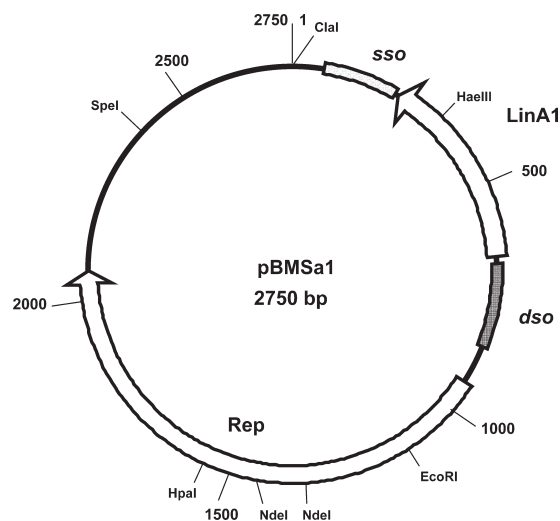


Fig. 1. Physical map and genetic organization of the pBMSa1 plasmid. Hollow arrows indicate the orientation and location of putative ORFs, including those that probably code for Rep and LinA1 proteins. Shaded bars indicate the replication origins *dso* and *sso*. Restriction sites were determined by sequence analysis and confirmed by endonuclease digestion.

pBMSa1 was found to be 29.77% (461G, 1022A, 909T, and 358C), which is in agreement to that of other staphylococcal plasmid sequences (Heir et al., 1998; Moon et al., 1996). Nucleotide sequence analysis revealed that pBMSa1 is a new member of the pC194 family of rolling-circle replication plasmids. This affirmation is based on the presence of the cassette-like structure, comprising the *linA1* gene, typically located between the nick site and the *ssaA* sequence and the similarities between *rep* from pBMSa1 and other replication genes located on plasmids of the pC194 family (http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR/DPR_RCRdata.htm).

Sequence analysis of pBMSa1 revealed two putative open reading frames (ORFs) with a coding capacity for more than 100 amino acids. According to Fickett's analysis (Fickett, 1982), only ORF2 has high probability to be considered an actual coding region. It is worth to notice that Fickett's prediction is only a theoretical approach to ORF feasibility and shows important limitations, especially when ORFs are overlapped or uncommon codons are used. In fact, when the deduced sequences of each ORF in pBMSa1 were compared separately with the GenBank database, both ORFs showed significant levels of homology with other registered sequences.

The putative ORF1 (nucleotides 939–1943, 39.2 kDa) gene product is homologous to the replication protein (Rep) of small multicopy plasmids of Gram-positive bacteria. The highest homologies were found with Rep proteins of the pKH4 (GenBank U81980), pST94 (Heir et al., 1998), and pKH8 (Moon et al., 1996) plasmids of *S. aureus*, with 97, 93.7, and 92.2% of identity, respectively. These plasmids belong to the Group III of RCR plasmids (http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR/DPR_RCRdata.htm) in which the most relevant members are the plasmids pC194 and pUB110 of *S. aureus*. An amino acid alignment analysis of Group III Rep proteins is shown in Fig. 2A. Motifs I and III contain cysteine and histidine residues, respectively, involved in the interaction with a putative heavy metal ligand. Motif IV is considered to be the enzymatic active site with the Tyr and Glu residues playing a key role in the nicking process and in circularization of single-

strand intermediates (Andrup et al., 2003; Holtwick et al., 2001). The highest identities of Rep conserved motifs of pBMSa1 were to those contained in pKH4 and pKH8 plasmids. Motif IV was identical to Rep protein from pKH4, pKH8, and pTS94 plasmids. The ORF1 region is preceded by a putative Shine–Dalgarno region (5'-TACTGG AGG-3') located nine nucleotides upstream from the ATG. Moreover, hexanucleotide sequences containing 5'-TTGACA-3' and 5'-TAATAA-3' motifs located 65 and 45 nucleotides, respectively, from the ATG, and spaced by 14 non-conserved nucleotides, resemble the typical prokaryotic promoter consensus (Moran et al., 1989).

The putative ORF2 (nucleotides 721–236, 19 kDa) gene product is homologous to lincosamide *O*-nucleotidyltransferases encoded by two closely related genes from *Staphylococcus* named *linA* and *linA'* which confer resistance only to lincosamides. Fig. 2B shows a sequence alignment analysis of lincosamide proteins from different staphylococci plasmids including the LinA1 protein from pBMSa1. The highest homology was found with lincosamide proteins LinA' (Brisson-Noël et al., 1988), LinA (Brisson-Noël and Courvalin, 1986), and LinA_{N2} (Wang et al., 2000) with a 96.3, 92.5, and 52.2% of identity, respectively. Although several lincosamide genes have been previously characterized, it is the first resistance gene to lincomycin from a bovine *S. aureus* isolate. The *linA1* region is preceded by a putative Shine–Dalgarno region (5'-AATTAGGAGG-3') located six nucleotides upstream from the ATG which is identical to that of the gene *linA'* (Brisson-Noël et al., 1988). We found in the putative promoter region of *linA1* from pBMSa1 two sequences with a 17-nucleotides spacer, 5'-TTGATT-3' and 5'-TATGAT-3', located 251 and 228 nucleotides, respectively, from the ATG, which could correspond to the -35 and -10 sequences of a prokaryotic promoter; both consensus are identical to that of *linA'* gene (Brisson-Noël et al., 1988).

The DNA of pBMSa1 between nucleotides 661 and 850 exhibits multiple inverted repeated sequences that are typical of the double-strand origin of replication (*dso*) of some RCR plasmids. Clustal V alignment showed that this region shares 57.9% identity with pC194 DNA between nucleo-

A Plasmids		Motif I		Motif II	
pBMSa1	77	T W F C K S K L C P V C N W R R A M	117	L F L T L S T K	
pKH4	77	T W F C K S K L C P V C N W R R A M	117	L F L T L S T K	
pKH8	77	T W F C K S K L C P V C N W R R A M	117	L F L T L S T K	
pST94	77	T W F C K S K L C P V C N W R R A M	117	L F L T L S A R	
pUB110	76	V W F C K S R L C P M C N W R R A M	116	L F L T L T V K	
pC194	94	A N S C K N R F C P V C A W R K A R	139	I F L T L T T P	
		* * * *		* * *	
		Motif III		Motif IV	
pBMSa1	173	S Y N Q H M H V L L	235	A I K E T S K Y S V K	
pKH4	173	S Y N Q H M H V L L	235	A I K E T S K Y S V K	
pKH8	173	S Y N Q H M H V L L	235	A I K E T S K Y S V K	
pST94	173	S Y N Q H M H V L L	235	A I K E T S K Y S V K	
pUB110	172	S Y N Q H M H V L V	234	A I D E T A K Y P V K	
pC194	207	D Y N P H F H V L I	282	E L Y E M A K Y S G K	
		* *		* *	
B					
LinA1	pBMSa1	1	M-KIDNVTEKDLFYILDFFEKMEVTYWLDGGWGV	DVLTGKQ	40
LinA'	pIP856	1	M-KIDNVTEKDLFYILDLEFEKMEVTHWLDGGWGV	DVLTGKQ	40
LinA	pIP855	1	M-KNNNVTEKELFYILDLEFEHMKVTYWLDGGWGV	DVLTGKQ	40
LinA _{N2}	NBU2*	1	MTKKEHTTITELFQVLDLLESLDMQFWLDGGWGV	DVLYGQQ	41
LinA1	pBMSa1	41	QREHRDIDIDFDAQHTQKVIQKLDIGYKIEVDWMP	SRMELK	82
LinA'	pIP856	41	QREHRDIDIDFDAQHTQVIKKLEDIGYKIEVDWMP	SRMELK	82
LinA	pIP855	41	QREHRDIDIDFDAQHTQKVIQKLEDIGYKIEVHWMP	SRMELK	82
LinA _{N2}	NBU2*	42	TRLHRDIDIDFDANYTDQLLDLLQERGYQIETNWL	PTRVELY	83
LinA1	pBMSa1	83	HKEYGYLDIHPINLNDDGSITQANPEGGNYVFQ	NEWFSETN	123
LinA'	pIP856	83	HKEYGYLDIHPINLNDDGSITQANPEGGNYIFQ	NEWFSETN	123
LinA	pIP855	83	HEEYGYLDIHPINLNDDGSITQANPEGGNYVFQ	NDWFSETN	123
LinA _{N2}	NBU2*	84	SKELGYYLDIHPFVLNADGTSKQADLDGGWYEFQ	PDYFGTAV	124
LinA1	pBMSa1	124	YKGRKIPICISKEAQLLFHSGYDLTEKDHFDIKNLK	-----SIT	161
LinA'	pIP856	124	YKGRKIPICISKEAQLLFHSGYELTEKDHFDIKNLK	-----SIT	161
LinA	pIP855	124	YKDRKIPICISKEAQLLFHSGYDLTETDHFDIKNLK	-----SIT	161
LinA _{N2}	NBU2*	125	FEGRSIPICISAKGQVVFHSGYDLREKDIHDL	SIKQCITTM	SLTIR 170

Fig. 2. Comparison of putative open reading frames of the plasmid pBMSa1. (A) Alignment of replication proteins motifs encoded by members from Group III of RCR plasmids. Motifs present in most RCR Rep proteins are indicated and amino acids conserved in all replication proteins of RCR are indicated by asterisks. Conserved residues are shown in bold. Numbers on the left indicate the location of the motifs in the Rep. (B) Alignment of lincosamide proteins encoded by staphylococci plasmids and a mobilizable transposon. Conserved residues are shown in bold. Numbers indicate the location of the residues in the LinA. *NBU2 is a mobilizable element from *Bacteroides* sp.

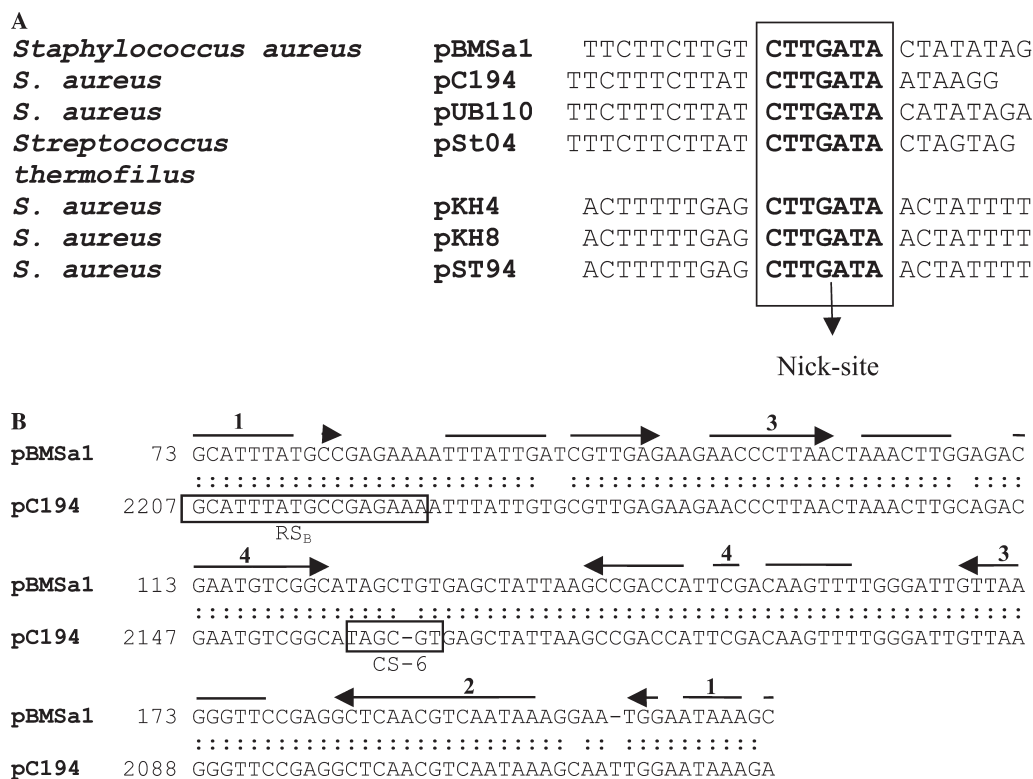


Fig. 3. *dso* and *sso* of the plasmid pBMSa1. (A) Sequence alignments of *dso*s of replication from plasmids belonging to the Group III of RCR plasmids. Bold and boxed sequences are highly conserved. The nick site is indicated by a vertical arrow. (B) Alignment of the pBMSa1-*ssoA* region and the pC194 DNA sequence. The two sequence elements of the pC194-*ssoA* that are conserved in many *ssoA*s (RS_B and CS-6) are boxed. Dots indicate nucleotides conserved in both plasmid DNAs. Numbers and arrows indicate perfect and imperfect palindromic arrangements of bases.

tides 915 and 1103 (Horinouchi and Weisblum, 1982), comprising the respective *dso*. In RCR plasmids of the Group III (pC194/pUB110 type plasmids), the highly conserved *dso*s which are important in the binding of Rep protein and the nicking of the double strand, are usually located immediately upstream of the *rep* gene. Therefore, we searched for the corresponding origin of replication in pBMSa1 plasmid. Such sequence is located upstream of the *rep* gene. As depicted in Fig. 3A, the *dso* of replication of pBMSa1 contains the highly conserved sequence 5'-CTTGATA-3' and it is identical to the origin described for plasmids from Group III. Although both pBMSa1 and pC194-*dso*s include several inverted repeat sequences, the arrangement of these palindromes is different in each plasmid resulting in distinct global

dso secondary structures that might extrude on the supercoiled DNA of either plasmid (data not shown).

In addition to the *dso*, where the leading-strand synthesis initiates, RCR plasmids contain the single-strand origin (*sso*) which is a signal involved in initiation of synthesis of the lagging-strand and is efficiently recognized by the machinery of its natural host (Kramer et al., 1995). Four types of *sso* (*ssoA*, *ssoT*, *ssoU*, and *ssoW*) have been described in bacterial RCR plasmids (Kramer et al., 1999). Although signals belonging to the *ssoU*-type are efficiently recognized in a broad range of hosts, most *ssos* exhibit a narrow-host-range, being only functional in a few bacterial species (Kramer et al., 1995; van der Lelie et al., 1989). A 161 bp region of pBMSa1 shows

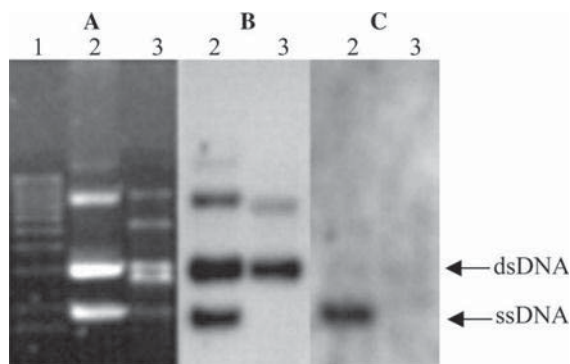


Fig. 4. Detection of ssDNA intermediates of the plasmid pBMSa1. (A) Agarose gel; (B) Southern blot, transferred under denaturing conditions; (C) Southern blot, transferred under native conditions. Lane 1: 1 kb DNA ladder; lane 2: undigested plasmids of *S. aureus* SA35; lane 3: plasmids of *S. aureus* SA35, digested with S1 nuclease. The 2.7 kb *EcoRI* fragment of pBMSa1 was used as a probe.

significant homology to *ssO* of plasmid pC194 (96%) from *S. aureus* (Horinouchi and Weisblum, 1982). This region (bases 73–234) contains four

potential stem-and-loop structures, according to four palindromic imperfect sequences located throughout this region, very similar to those found in the plasmid pC194. Fig. 3B shows the location of these structures and their comparison to those in the plasmid pC194. The *ssO* of pBMSa1 belongs to the *ssO*A type and consequently shows the highest homology to the pC194 plasmid family (Horinouchi and Weisblum, 1982), because palindromic structures are almost identical in both plasmids.

In addition to the homology found in the putative *dso* and *ssO* in pBMSa1 with other RCR plasmids, the finding of ssDNA replication intermediates would strongly support the assumption that this plasmid replicates by the rolling-circle process. To test this, Southern blotting under native conditions, combined with S1 nuclease digestion of ssDNA, was performed. Fig. 4A shows an agarose gel with plasmid DNA of the *S. aureus* SA35 isolate, both undigested and digested with S1 nuclease (lanes 2 and 3).

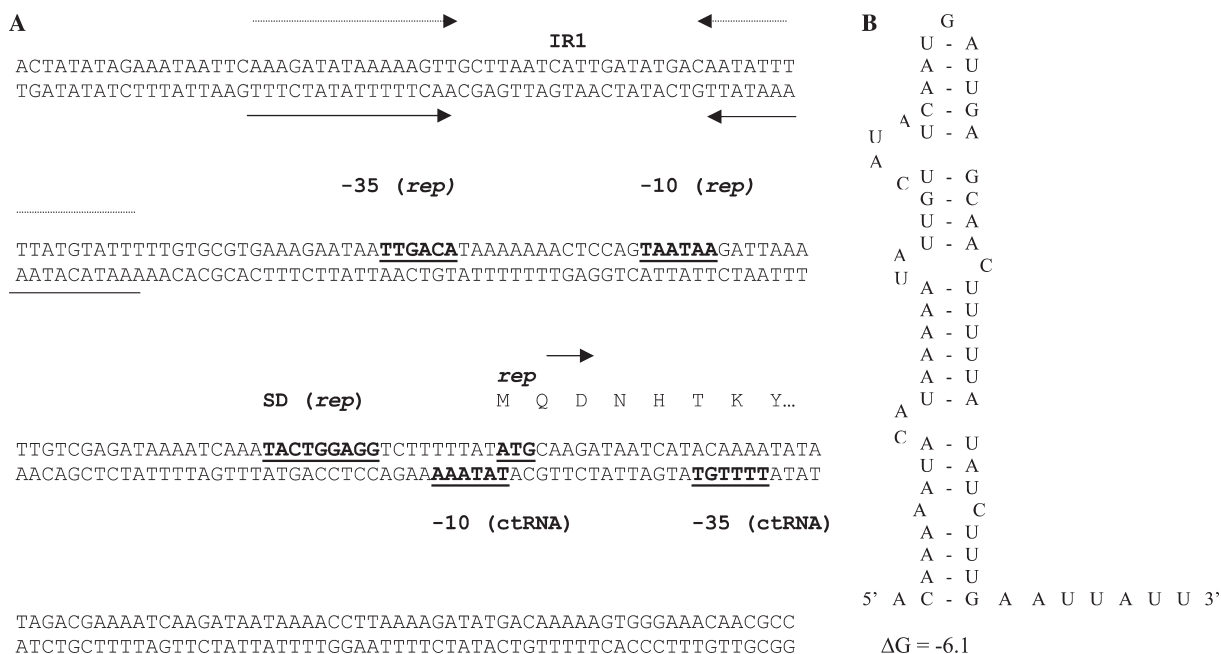


Fig. 5. Regulation of replication of the plasmid pBMSa1. (A) Double-strand sequence of the region upstream *rep* gene indicating the start codon of *rep* gene with its Shine–Dalgarno (SD), the putative promoter –10 and –35 boxes of *rep* gene and antisense RNA, which are shown as a boldface underlined letter, and the imperfect inverted repeat representing the transcriptional terminator of ctRNA (IR1). (B) Putative secondary structure of the terminator. The free energy of the RNA hairpin formation (ΔG) is displayed below the RNA sequence.

When plasmids were blotted to membranes under denaturing conditions all conformational structures of undigested pBMSa1 were detected, using the *EcoRI* fragment of pBMSa1 as a probe (Fig. 4B, lane 2). However, when plasmid pBMSa1 was digested with the S1 nuclease one band disappeared (Fig. 4B, lane 3), indicating its ssDNA nature. Additionally, when plasmids were blotted under non-denaturing conditions, only one band of the undigested plasmid pBMSa1 corresponding to the ssDNA intermediate was detected (Fig. 4C, lane 2). This band has the same electrophoretic mobility as the band absent when plasmid was digested with S1 nuclease. As expected, no bands were detected when samples were digested with the S1 nuclease (Fig. 4C, lane 3). These results indicate the presence of a pBMSa1 ssDNA intermediate in the plasmid preparations of *S. aureus* SA35 isolate.

In many RCR plasmids, replication, and hence copy number, is controlled by small *rep* antisense transcripts or ctRNA (Wagner and Simons, 1994). Although the existence of a regulatory ctRNA element has not been directly demonstrated in pC194, a mechanism involving interaction between a putative ctRNA and the *rep* mRNA in a manner that interferes with *rep* translation has been suggested to control replication of pC194 (Alonso and Taylor, 1987). Analysis of the nucleotide sequence of pBMSa1 around the 5' end of the putative *rep* gene (ORF1) indicates the presence of a putative promoter with a –35 hexanucleotide (5'-TTTTGT-3', nucleotides 954–959) and a –10 box (5'-TATA AA-3', nucleotides 934–939) (Fig. 5A). The ATG start codon of the putative *rep* gene overlapping the –10 box of the promoter that would direct synthesis of the ctRNA (Fig. 5A). At a short distance (about 100 nt) downstream from this putative promoter there is an inverted repeat sequence which could function as an intrinsic transcriptional terminator with a calculated free energy (ΔG) of formation of the corresponding RNA hairpin of –6.1 kcal/mol (Fig. 5B), which suggests that this sequence constitutes a rho-independent transcriptional terminator.

In conclusion pBMSa1 is a RCR plasmid related to pC194 plasmid family encoding a *linA* homologous gene conferring resistance to lincosamin.

Acknowledgments

The authors thank the excellent technical support of Juan José Guzmán Martínez. This work was supported by grants from Coordinación de Investigación Científica (UMSNH) and CONACYT (38746-B, México) to J.E.L.M. P.D.L.L. was supported by a scholarship from UMSNH.

References

- Andrup, L., Jensen, G.B., Wilcks, A., Smidt, L., Hoflack, L., Mahillon, J., 2003. The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmid from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. *Plasmid* 49, 205–232.
- Alonso, J.C., Taylor, R.H., 1987. Initiation of plasmid pC194 replication and its control in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 210, 476–484.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Ayliffe, G.A.J., 1997. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 24, 574–579.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Bjorland, J., Steinum, T., Sunde, M., Waage, S., Heir, E., 2003. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3046–3052.
- Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J., Leclercq, R., 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 925–929.
- Brisson-Noël, A., Courvalin, P., 1986. Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus*. *Gene* 43, 247–253.
- Brisson-Noël, A., Delrieu, P., Samain, D., Courvalin, P., 1988. Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide *O*-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J. Biol. Chem.* 263, 15880–15887.
- Devriese, L.A., Baele, M., Vanechoutte, M., Martel, A., Haesebrouck, F., 2002. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows. *Vet. Microbiol.* 87, 175–182.
- Fickett, J., 1982. Recognition of protein coding regions in DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 10, 5303–5318.

- Firth, N., Skurray, R.A., 2000. The *Staphylococcus*—genetics: accessory elements and genetic exchange. In: Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., Rood, J.I. (Eds.), *Gram-Positive Pathogens*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 326–338.
- Heir, E., Sundheim, G., Holck, A.L., 1998. The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 49–56.
- Holtwick, R., Wallbrunn, V.A., Keweloh, H., Meinhardt, F., 2001. A novel rolling-circle-replication plasmid from *Pseudomonas putida* P8: molecular characterization and use as vector. *Microbiology* 147, 337–344.
- Horinouchi, S., Weisblum, B., 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* 150, 815–825.
- Kramer, M.G., del Solar, G., Espinosa, M., 1995. Lagging-strand origins of the promiscuous plasmid pMV158: physical and functional characterization. *Microbiology* 141, 655–662.
- Kramer, M.G., Espinosa, M., Misra, T.K., Khan, S.A., 1999. Characterization of a single-strand origin, *ssoU*, required for broad host range replication of rolling-circle plasmids. *Mol. Microbiol.* 33, 466–475.
- Kreiswirth, B., Konblum, J., Arbeit, R.D., Eisner, W., Maslow, J.N., McGreer, A., Low, D.E., Novick, R.P., 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 259, 227–230.
- Leclercq, R., Courvalin, P., 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1267–1272.
- Leclercq, R., Brisson-Noël, A., Duval, J., Courvalin, P., 1987. Phenotypic expression and genetic heterogeneity of lincosamide inactivation in *Staphylococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1887–1891.
- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M., Leclercq, R., Vandenesch, F., Etienne, J., 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1062–1066.
- Littlejohn, T.G., Paulsen, I.T., Gillespie, M.T., Tennent, J.M., Midgley, M., Jones, I.G., Purewal, A.S., Skurray, R.A., 1992. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 95, 259–266.
- López-Meza, J.E., Barboza-Corona, J.E., Del Rincón-Castro, C., Ibarra, J.E., 2003. Sequencing and characterization of plasmid pUIBI-1 from *Bacillus thuringiensis* serovar *entomocidus* LBIT-113. *Curr. Microbiol.* 47, 395–399.
- Moon, K.H., Im, S.H., Yoon, S.J., Kim, W.K., Shin, C.K., Lee, D.W., 1996. Characterization of cryptic plasmid of multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* SA2. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 145–146.
- Moran Jr., C.P., Lang, N., LeGrice, S.F.J., Lee, G., Stephens, M., Sonnenshein, A.L., Pero, J., Losick, R., 1989. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 186, 339–346.
- Novick, R.P., 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 537–565.
- Russell, A.D., 1997. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J. Appl. Microbiol.* 83, 155–165.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
- Sutra, L., Poutrel, B., 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40, 79–89.
- van der Lelie, D., Bron, S., Venema, G., Oskam, L., 1989. Similarity of minus origins of replication and flanking open reading frames of plasmids pUB110, pTB913 and pMV158. *Nucleic Acids Res.* 17, 7283–7294.
- Wagner, E.G., Simons, R.W., 1994. Antisense RNA control in bacteria, phages and plasmids. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 713–742.
- Wang, J., Shoemaker, N.B., Wang, G.R., Salyers, A., 2000. Characterization of a bacteroides mobilizable transposon, NBU2, which carries a functional lincomycin resistance gene. *J. Bacteriol.* 182, 3559–3571.
- Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E., Tenover, F.C., 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302, 1569–1571.

Communicated by M. Espinosa

MECANISMOS DE REPLICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS BACTERIANOS*

PEDRO D. LOEZA LARA, JUAN J. VALDEZ ALARCÓN,
VÍCTOR M. BAIZABAL AGUIRRE Y JOEL E. LÓPEZ MEZA

RESUMEN

Los plásmidos bacterianos son moléculas de ADN extracromosómico que juegan un papel importante en la adaptación bacteriana a diferentes ambientes, ya que promueven la transferencia de genes entre estos microorganismos. Se conocen tres mecanismos principales de replicación de los plásmidos circulares: a) el mecanismo de replicación asimétrico por el círculo rodante, b) el mecanismo tipo *theta* y, c) el mecanismo por desplazamiento de la cadena. Estudios recientes relacionan el mecanismo de replicación de los plásmidos con su capacidad para colonizar diferentes hospederos. El establecimiento de un plásmido en diferentes hospederos puede tener implicaciones biotecnológicas importantes, ya que estas moléculas con frecuencia son útiles en el diseño de herramientas moleculares.

PALABRAS CLAVE: Plásmido, replicación, círculo rodante, mecanismo *theta*, desplazamiento de la cadena.

ABSTRACT

Bacterial plasmids are extrachromosomal DNA molecules which play important roles for bacterial environmental adaptation due to their ability to transfer genes among bacterial populations. Three mechanisms for circular plasmid replication have been described: a) the rolling circle asymmetric mode, b) the *theta* mechanism and, c) the strand displacement mechanism. Recent studies have related the plasmid replication mechanism with the enormous ability of these replicons to colonize different hosts. Establishment of a plasmid in different hosts may have important biotechnology implications, because plasmids are often useful as molecular tools.

KEY WORDS: Plasmid, replication, rolling circle, *theta* mechanism, strand displacement.

INTRODUCCIÓN

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que se han encontrado esencialmente en todos los tipos de bacterias estudiadas hasta la fecha. Dependiendo de su tamaño pueden codificar desde unas cuantas proteínas hasta cientos de ellas. Sin embargo, raramente codifican productos esenciales para el crecimiento celular, tales como ARN polimerasas o enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos. En cambio, los productos de sus genes generalmente dan a las bacterias una ventaja selectiva sólo bajo ciertas condiciones. La resistencia a antibióticos como la ampicilina, tetraciclina y kanamicina; la nodulación de raíces de leguminosas; y la producción de antibióticos

como la bacteriocina (activa contra otras especies bacterianas), son algunas características fenotípicas codificadas por los plásmidos (1, 2).

Los plásmidos varían ampliamente en tamaño, desde miles a cientos de miles de pares de bases (un tamaño comparable al cromosoma bacteriano) y son, con mayor frecuencia, moléculas circulares de ADN de doble cadena. Sin embargo, algunas bacterias poseen plásmidos de estructura lineal, la cual no es una característica común en los plásmidos bacterianos por lo que no serán discutidos en esta revisión. Estos elementos juegan un papel crucial en la evolución y adaptación bacterianas, ya que son mediadores del intercambio de material genético entre estas poblaciones. La transferencia de la información

genética contenida en el plásmido de una bacteria donadora a una receptora se conoce con el nombre de conjugación. Este proceso requiere de la expresión de genes y de la presencia de regiones en el ADN del plásmido necesarios para su movilización. El plásmido se moviliza a través de un puente de conjugación entre las células (2).

La transferencia de ADN de la bacteria tumorigénica *Agrobacterium tumefaciens* a la planta hospedera ocurre por un mecanismo semejante a la conjugación. Además, algunos plásmidos se recombinan de manera dinámica entre sí o con el genoma, constituyendo una fuente de diversidad genética importante para las bacterias (2, 3).

* Recibido: 9 diciembre 2003 Aceptado: 27 mayo 2004

TABLA I

PLÁSMIDOS UTILIZADOS COMO HERRAMIENTAS IMPORTANTES EN ESTUDIOS BIOTECNOLÓGICOS.

Plásmido	Aplicaciones	Algunas Características
pBR322	Vector de clonación	Origen de ColE1, <i>bla</i> , <i>tet</i> selección de recombinantes por color
pTrcHis A	Vector de expresión; purificación de proteínas recombinantes	Origen de pBR322, <i>bla</i> , <i>trc</i> Promotor, histidinas, péptido señal
pGV2260	Generación de plantas transgénicas; transformación con <i>A. tumefaciens</i>	Contiene los bordes del T-DNA del plásmido Ti y secuencias de pBR322
pKM101	Plásmido conjugativo	<i>Ori T</i> , <i>tra</i> , <i>eex</i>
pTn5 <i>cat</i>	Plásmido multifuncional con características de transposón, para mutagénesis, identificación de promotores y conjugación	Plásmido: <i>tet</i> , <i>tnp</i> ; Transposón: origen de ColE1, <i>cat</i> (sin promotor), <i>neo</i> , región Mob
BAC's, YAC's	Plásmidos con elementos del cromosoma para conferir estabilidad mitótica en bacterias (BAC) y levaduras (YAC)	BAC's: <i>OriS</i> , <i>repE</i> , <i>parA</i> , <i>B</i> y <i>C</i> YAC's: <i>Ori</i> , <i>ARS1</i> , <i>Amp</i> , <i>TRP1</i> , <i>CEN4</i>

Bla, β -lactamasa (resistencia a ampicilina); *tet*, resistencia a tetraciclina; *trc*, promotor de triptofano; *oriT*, origen de transferencia; *tra*, genes que codifican funciones de transferencia; *eex*, genes que previenen la entrada de otros plásmidos; *tnp*, transposasa; *cat*, resistencia a cloranfenicol; *neo*, resistencia a kanamicina; Mob, región necesaria para la conjugación; *OriS*, origen basado en el factor F para clonación de fragmentos mayores de 350 kpb; *repE*, helicasa, *parA*, *B* y *C*, facilitan la división exacta del plásmido; *Ori*, origen de replicación de ColE1; *ARS1*, secuencia de replicación autónoma; *Amp*, resistencia a ampicilina; *TRP1*, auxotrofia sobre triptofano; *CEN4*, secuencia permite una segregación eficiente del cromosoma entre células hijas.

Desde los puntos de vista básico y aplicado, los plásmidos han servido como herramientas importantes en estudios de Biología Molecular y Biotecnología. La Tabla I muestra algunos ejemplos del uso de los plásmidos como herramientas biotecnológicas y algunas de sus características. En este sentido, la mayoría de los plásmidos naturales no son vectores de clonación o de expresión convenientes. Sin embargo, pueden ser modificados para su uso como tales. Para lograr el diseño y construcción de vectores de clonación de amplio rango de hospederos (vector que tiene la capacidad de replicarse en otras bacterias), vectores binarios (vectores "shuttle", con dos orígenes de replicación distintos), es necesario conocer las características o factores moleculares que les permiten

a estos plásmidos colonizar y mantenerse en diferentes hospederos; de ahí la importancia de estudiar los mecanismos de replicación. Otro ejemplo de vectores que se pueden replicar en bacterias y otros hospederos, por contener un origen de replicación bacteriano y elementos que contribuyen a la estabilidad de los cromosomas, lo constituyen los cromosomas artificiales de bacterias, levaduras y mamíferos (BAC's, YAC's y MAC's, respectivamente), elementos ampliamente utilizados en la caracterización de los genomas de diversos organismos por su capacidad de contener fragmentos de ADN muy grandes (~300, ~2000 y más de 1000 kpb, respectivamente).

Los plásmidos se replican de manera autónoma con respecto al

cromosoma, ya que codifican elementos propios que controlan su replicación. La Tabla II muestra una breve comparación de algunas características y factores involucrados en la replicación de los plásmidos y el cromosoma bacteriano (1). Algunos plásmidos se replican en pocas especies bacterianas y se dice que poseen un rango de hospederos reducido. Un segundo grupo de plásmidos se replica en un amplio rango de hospederos y se les denomina promiscuos (4). Existen diversos factores que influyen en la capacidad de los plásmidos para colonizar diferentes hospederos; una replicación eficiente es el paso más crítico y es el resultado de una interacción adecuada entre el plásmido y el hospedero. Esta interacción plásmido-hospedero se ha estudiado con detalle debido a las implicaciones básicas y de aplicación biotecnológica que representa (5).

Los primeros estudios sobre la replicación de estos elementos fueron realizados con plásmidos de *Escherichia coli* como ColE1, pSC101, R6K, R1, RK2 y F, que tienen como una característica común que replican su material genético por el mecanismo tipo *theta* (1). Recientemente se ha caracterizado un gran número de plásmidos pequeños (2-15 kb) que se replican por mecanismos diferentes al anterior. Estos son: a) el mecanismo del círculo rodante, originalmente observado en bacteriófagos de ADN de cadena sencilla (ADNcs) de *E. coli*; b) el mecanismo llamado por desplazamiento de la cadena, cuyos plásmidos representativos son elementos promiscuos asociados a la familia IncQ (plásmidos del grupo de incompatibilidad Q) cuyo prototipo es el plásmido RSF1010 de *E. coli* (1, 6).

En esta revisión se presenta un análisis de los diversos mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos, y se mencionan las ventajas y desventajas de cada mecanismo con relación a sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN POR EL

TABLA II

COMPARACIÓN DE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS Y FACTORES INVOLUCRADOS EN LOS MECANISMOS DE REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS BACTERIANOS Y EL CROMOSOMA.

Característica	Mecanismo de replicación			
	Círculo rodante	<i>Theta</i>	Desplazamiento de la cadena	Cromosoma bacteriano
Proteína iniciadora	Rep (endonucleasa)	Rep y/o RNAP (helicasa)	Rep (helicasa)	DnaA (helicasa)
Función de la proteína iniciadora	Corta una de las cadenas de ADN	Apertura de la doble hélice	Apertura de la doble hélice	Apertura de la doble hélice
Proteína iniciadora codificada por:	Plásmido	Rep: plásmido ARNp: hospedero	Plásmido	Hospedero
Intermediarios de ADNcs	Genera intermediarios	No genera intermediarios	**	No genera intermediarios
Simetría en el mecanismo de replicación	Asimétrico	Simétrico	**	Simétrico
Grupos de incompatibilidad	Ausentes	Presentes	Presentes	Ausentes

** Existen ambas características en diferentes plásmidos dentro del mismo grupo. ARNp = ARN polimerasa

MECANISMO DEL CÍRCULO RODANTE

La mayoría de los plásmidos de bacterias Gram positivas con un número grande de copias se replican por un mecanismo asimétrico llamado círculo rodante o RC (por sus siglas en inglés "rolling circle"). La replicación de estos plásmidos denominados RC, se realiza en dos etapas bien definidas, la síntesis de la cadena temprana y la síntesis de la cadena tardía. Este mecanismo no está restringido a plásmidos de bacterias Gram positivas y se han incrementando los reportes de plásmidos RC caracterizados en bacterias Gram negativas y *Arqueas* (7).

Para que ocurra la replicación de un plásmido RC se requieren tres módulos estructurales: (i) El gen *rep* que codifica la proteína iniciadora de

la replicación (Rep) de la cadena temprana y sus elementos regulatorios; (ii) el origen de replicación de la doble cadena (*dso*), el cual es reconocido por la proteína Rep; y (iii) el origen de la cadena sencilla (*sso*), reconocido por factores del hospedero (ARN polimerasa). En los plásmidos RC pueden estar presentes otros módulos no esenciales para la replicación, como el gen *mob*, el cual codifica una proteína involucrada en la movilización de diversos plásmidos (de manera natural, algunos plásmidos poseen estos genes *mob* cuyo producto participa en la transferencia de ADN), o bien los genes de resistencia a antibióticos (Fig. 1a) (1, 4).

La proteína Rep posee actividad de endonucleasa (enzima que se une al ADN y corta una de las cadenas en un sitio específico), ya que se une al

origen de replicación del plásmido (función equivalente a la de la proteína DnaA en el origen de replicación del cromosoma bacteriano), con lo que libera la tensión generada por la separación de las cadenas al inicio de la replicación (3). Por otra parte, el origen *dso* posee dos regiones importantes para la replicación, una involucrada en la unión de la proteína Rep y otra que contiene el sitio de corte para la actividad de endonucleasa específica de Rep. La región de ADN a la cual se une Rep incluye secuencias repetidas invertidas, las cuales tienen la capacidad de formar estructuras de tallo y asa, importantes para el inicio de la replicación, ya que el sitio de corte de Rep se encuentra en el asa de la horquilla (Fig. 1b). El origen *sso* también tiene la capacidad de formar estructuras secundarias debido a las secuencias repetidas invertidas que posee. Se ha postulado que la formación de dichas estructuras es importante para el reconocimiento de los factores del hospedero (como la ARN polimerasa), los cuales son esenciales para el inicio de la síntesis de la cadena tardía (Fig. 1c) (3, 8).

REPLICACIÓN POR EL MECANISMO DEL CÍRCULO RODANTE

El primer evento durante el inicio de la replicación RC involucra una interacción entre la proteína Rep y la región del *dso*, específicamente en el sitio denominado "*bind*". Posteriormente, Rep elabora un corte de una hebra, o "nick", en una región específica del ADN, el asa, lo cual genera extremos 5'P y 3'OH libres. La proteína Rep se une al extremo 5'P con lo cual se inicia la síntesis de la cadena temprana por medio de la extensión del extremo 3'OH libre, el cual es reconocido por la ADN polimerasa III. La extensión procede hasta que la cadena temprana es completamente desplazada. Posteriormente, Rep realiza un segundo corte en el límite entre la nueva cadena y la original, donde se ha regenerado el sitio de corte. Con esto se producen dos moléculas, una de ADN

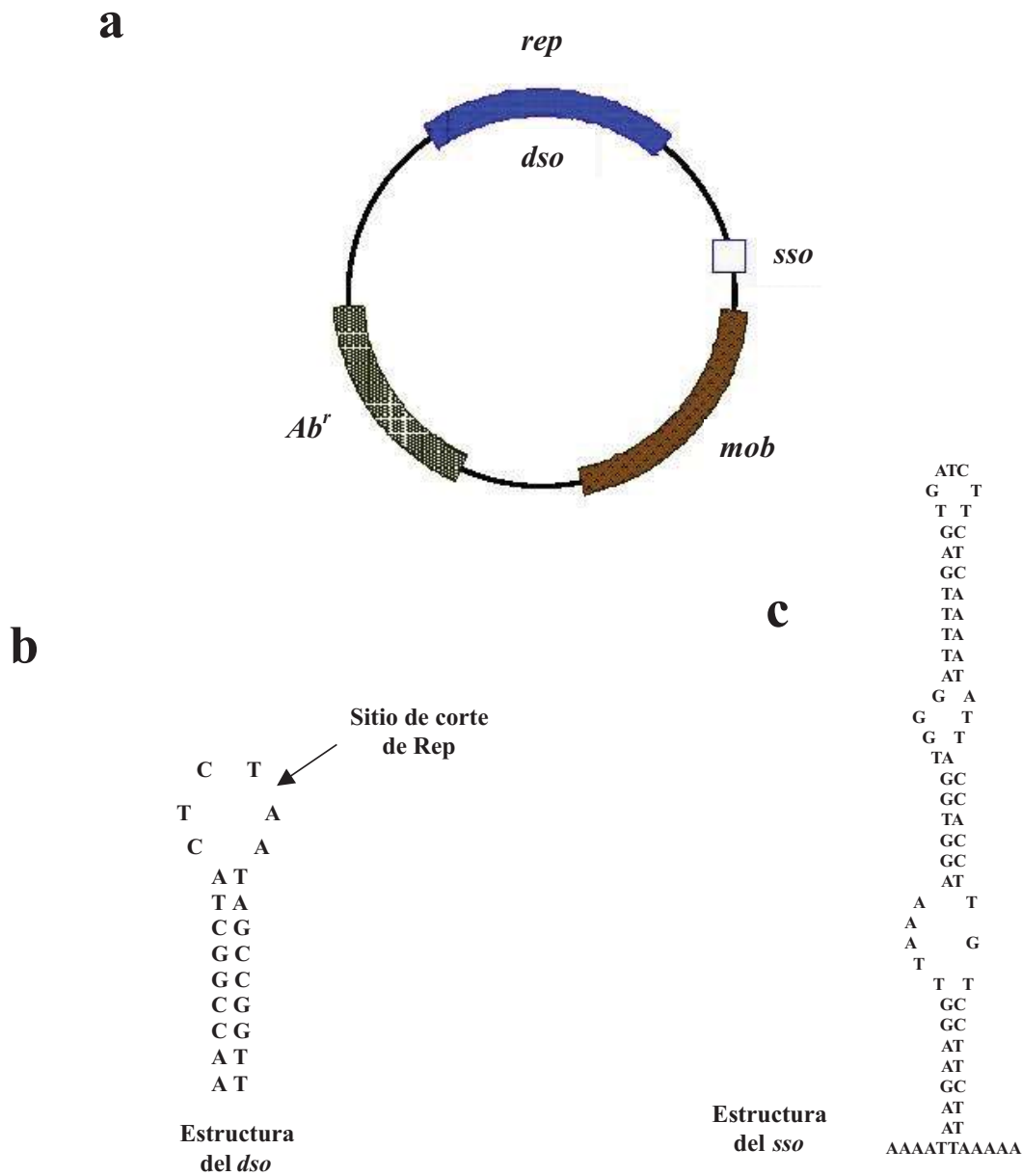


Figura 1. Características de los plásmidos RC. a) Esquema general de un plásmido RC. *rep* = gen que codifica a la proteína Rep involucrada en la replicación; *dso* = origen de replicación de la doble cadena; *sso* = origen de replicación de la cadena sencilla; *mob* = gen que codifica una proteína involucrada en la movilización del plásmido; *Ab'* = determinante de resistencia a antibióticos. b) Estructura tallo-asa formada por el origen de replicación de la doble cadena (*dso*) del plásmido RC pT181 de *Staphylococcus aureus*. Se muestra el sitio de corte de la endonucleasa Rep. c) Estructura secundaria formada por el origen de la cadena sencilla (*sso*) del plásmido RC pUB110 de *S. aureus* (Tomado de referencias 1, 4).

de doble cadena y un monómero de cadena sencilla (Fig. 2) (1, 3).

Luego de una serie de eventos de corte y unión, la molécula de ADN de doble cadena (la cual contiene la cadena temprana recién sintetizada), es ligada y superenrollada por las enzimas ligasa y girasa, respectivamente (8). El ADN de cadena sencilla que fue desplazado es convertido a

ADN de doble cadena utilizando para ello la región del *sso*. Este origen es reconocido por la ARN polimerasa del hospedero, encargada de sintetizar un oligonucleótido con una longitud promedio de 20 bases, que funciona como iniciador, el cual posteriormente es extendido por la ADN polimerasa I seguido por la replicación de la ADN polimerasa III. Finalmente, esta

molécula de ADN es también ligada y superenrollada (Fig. 2) (3, 8).

El arreglo de estos plásmidos, constituido por los módulos necesarios para la replicación de la cadena temprana, replicación de la cadena tardía y módulos de transferencia de ADN ha evolucionado de tal manera que ha contribuido a incrementar la plasticidad del acervo genético

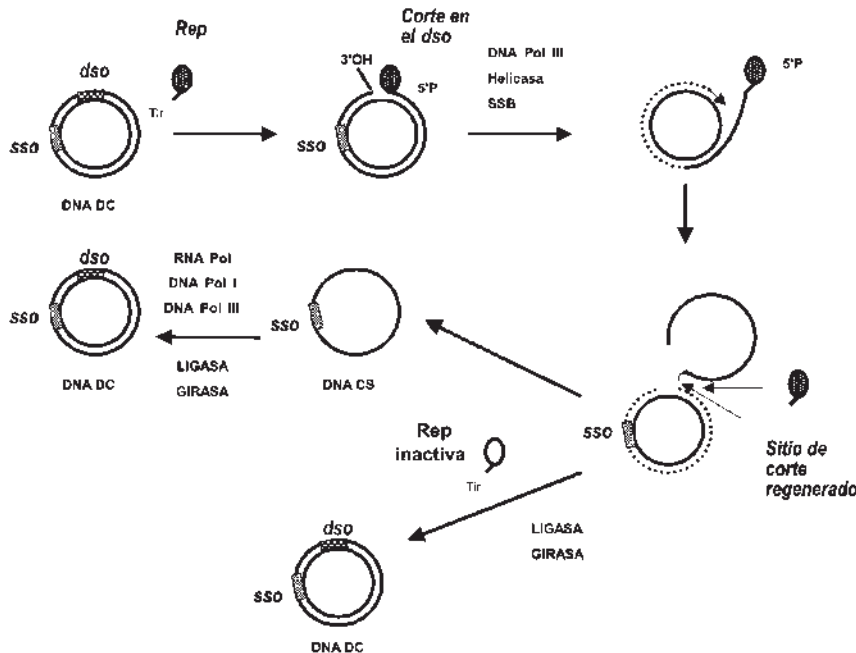


Figura 2. Modelo de la replicación de los plásmidos RC mediante un intermediario de cadena sencilla. Se representa el mecanismo asimétrico de la replicación, la síntesis de la cadena temprana y la generación del intermediario de cadena sencilla. Los detalles del modelo se explican en el texto. Tir = residuo de tirosina. Abreviaturas como en la figura 1 (Modificado de referencial 2).

procariótico (9). Algunos plásmidos han adquirido diversas secuencias, con lo cual han logrado intensificar su diseminación y han ampliado su rango de hospederos.

Ciertos plásmidos tienen varios *sso*, cada uno funcional en diferentes hospederos, mientras que otros poseen elementos de transposición, de tal manera que su composición modular y su presencia ubicua pueden ser facilitados por el amplio rango de hospederos y por los sistemas de transferencia horizontal de ADN. Por otra parte, los plásmidos RC carecen de grupos de incompatibilidad (incompatibilidad de plásmidos: fenómeno que se presenta cuando dos plásmidos no pueden coexistir en la misma célula, ya que comparten el mismo mecanismo de control de la replicación) por lo que permiten la replicación simultánea de otros plásmidos corresidentes (Tabla II) (1, 9).

Las características de los plásmidos RC son también importantes desde el punto de vista biotecnológico, ya que los plásmidos con distribución

amplia representan herramientas muy útiles en el diseño de vectores de clonación o de expresión (7). Existen varios ejemplos sobre el diseño y uso de vectores binarios a partir de plásmidos RC, entre ellos el plásmido pPP8-1 de *Pseudomonas putida* caracterizado por Holtwick y col en 2001. Una de las limitantes del uso de estos plásmidos como vectores es que algunos de ellos poseen sólo un sitio *sso*, el cual es reconocido de manera eficiente únicamente por los factores de su hospedero natural. Lo anterior trae como resultado la acumulación de multímeros de alto peso molecular (ADNcs), los cuales no pueden ser convertidos a ADN de doble cadena cuando se replican en otro hospedero.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN POR EL MECANISMO TIPO *theta*

La replicación por el mecanismo tipo *theta* (llamado así por la similitud de los intermediarios con la letra griega θ) está distribuida ampliamente entre plásmidos de bacterias Gram negativas

y Gram positivas. Este mecanismo de replicación requiere de dos módulos estructurales: (i) el gen que codifica la proteína Rep y sus elementos reguladores, y (ii) el origen de la replicación. Es importante resaltar que existen algunas excepciones para este mecanismo, ya que la replicación de algunos plásmidos se inicia de manera independiente de la proteína Rep, la cual es sustituida en su función por la ARN polimerasa del hospedero (8). El proceso consiste, de manera general, en la apertura de las cadenas de ADN en el origen de replicación y el ensamblaje secuencial de las proteínas involucradas en el inicio de la replicación, incluida la síntesis y extensión de los oligonucleótidos de ARN que funcionan como iniciadores (10).

Los orígenes de replicación poseen secuencias específicas características de cada plásmido, con las cuales interactúa la proteína Rep; estas secuencias poseen una región rica en A+T y uno o más sitios donde se une la proteína iniciadora DnaA del hospedero. En muchos casos el origen de replicación posee secuencias repetidas directas, llamadas iterones, las cuales son los sitios de unión de la proteína Rep y tienen otras funciones en el control de la replicación (Fig. 3a) (11).

REPLICACIÓN POR EL MECANISMO TIPO *theta*

Se han descrito dos mecanismos de replicación tipo *theta*: el primero es dependiente de factores de inicio codificados por el plásmido, como ocurre en los plásmidos de *E. coli* pSC101, R6K y R1. Este tipo de replicación requiere de las proteínas Rep codificadas por el plásmido y DnaA, del hospedero, para el inicio de la síntesis de ADN. La proteína Rep se une a los iterones formando un complejo de preiniciación; este complejo incluye a proteínas del hospedero como las helicasas DnaA, DnaB y DnaC, la ADN polimerasa III y la primasa. La replicación se inicia cuando Rep y DnaA interactúan con la región rica en A+T, en donde se inicia la apertura de las

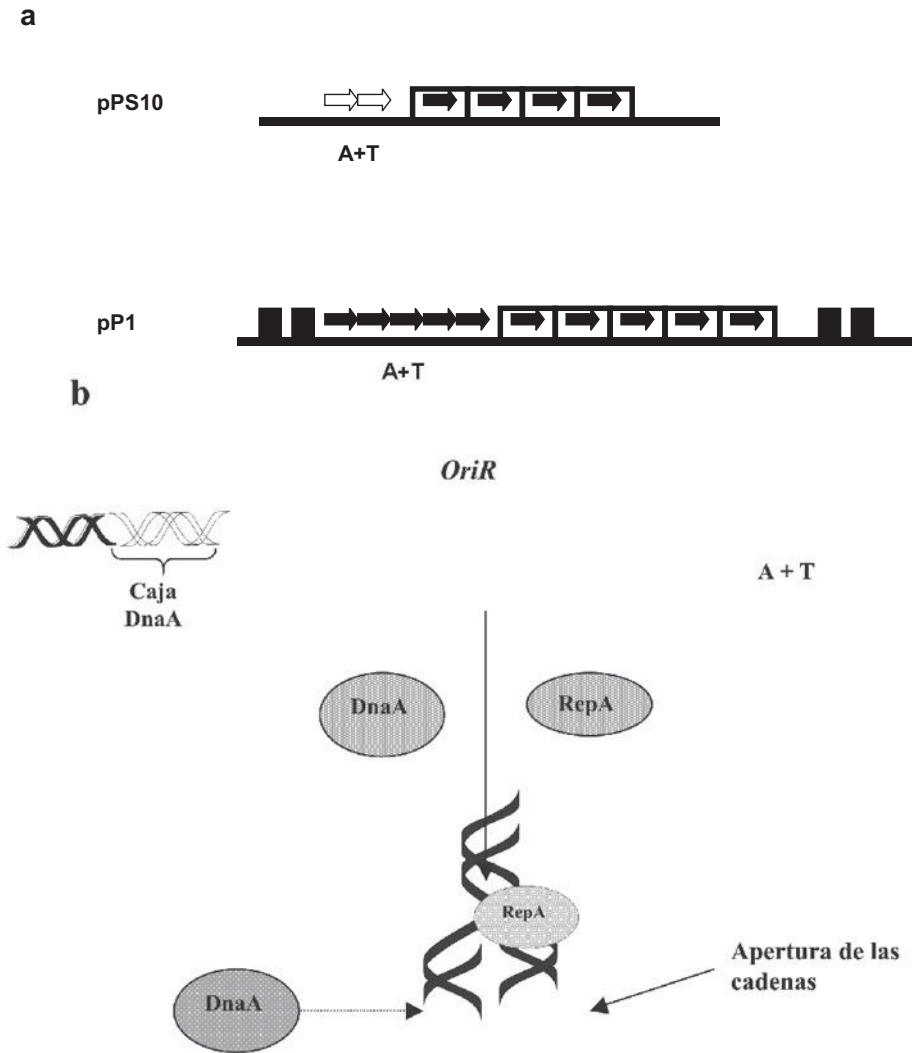


Figura 3. Características de la replicación por el mecanismo *theta*. a) Orígenes de replicación de los plásmidos pPS10 y pP1 que se replican por el mecanismo *theta*. Se muestran los iterones (flechas sólidas encerradas en cajas), las regiones ricas en A+T que contienen repetidos directos (flechas), las regiones de unión de la proteína DnaA (rectángulos sólidos). b) Modelo de la replicación por el mecanismo tipo *theta* dependiente de los factores del hospedero. Los detalles del modelo se explican en el texto (Modificado de referencia 8).

cadenas del ADN. DnaB y DnaC auxilian en esta apertura, seguida por la primasa la cual sintetiza un oligonucleótido de RNA iniciador, mismo que se extiende por la ADN polimerasa III hasta lograr la replicación completa de ambas cadenas (Fig. 3b) (12).

El segundo mecanismo de replicación tipo *theta* es independiente de factores iniciadores codificados por el plásmido. El replicón mejor caracterizado es el plásmido ColE1 de *E. coli*, cuya replicación involucra la actividad

consecutiva de la RNA polimerasa y DNA polimerasas I y III, entre otras proteínas. La RNA polimerasa del hospedero sintetiza un oligonucleótido para iniciar la replicación de la cadena temprana. La síntesis se inicia por la ADN polimerasa I, la cual incorpora aproximadamente 400 nucleótidos de la cadena temprana para posteriormente ser reemplazada por la ADN polimerasa III, la cual posee mayor capacidad de incorporación de nucleótidos. El cambio entre las ADN polimerasas I y III se favorece por proteínas unidas

a la cadena temprana (13).

La mayor parte de los plásmidos que se replican por el mecanismo tipo *theta* posee un rango de hospederos reducido; sin embargo, algunos de estos plásmidos presentan un amplio rango de hospederos, de manera similar que los plásmidos RC. Se ha establecido que algunos de los iterones son capaces de ejercer incompatibilidad, ya que presentan similitud con los iterones de otros plásmidos que se replican por el mismo mecanismo (Tabla II). Por otra parte, la mayoría de los plásmidos que se replican a través del mecanismo *theta* poseen un tamaño superior a 15 kb y se han utilizado para construir vectores de clonación; por ejemplo: los vectores pBR322, pUC19, pBluescript y pGEM son derivados de estos replicones. Estos vectores además han servido como base para el diseño de una gran variedad de nuevos vectores de clonación o de expresión, muchos de ellos disponibles de manera comercial (Tabla I).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN POR EL MECANISMO DE DESPLAZAMIENTO DE LA CADENA

Los ejemplos mejor conocidos de los plásmidos que se replican por el mecanismo de desplazamiento de la cadena son los elementos promiscuos asociados a la familia IncQ; por ejemplo: los plásmidos RSF1010 de *E. coli* (6) y pTC-F14 de *Acidithiobacillus caldus* (14). Los miembros de esta familia requieren para su replicación de tres proteínas codificadas por el plásmido. Estas proteínas promueven el inicio de la replicación, en el origen del plásmido, mediante la apertura de las cadenas de ADN en una región rica en A+T y la síntesis de oligonucleótidos de ARN como iniciadores de la replicación (14).

El origen de replicación incluye tres iterones idénticos de 20 pb (pares de bases), una región rica en

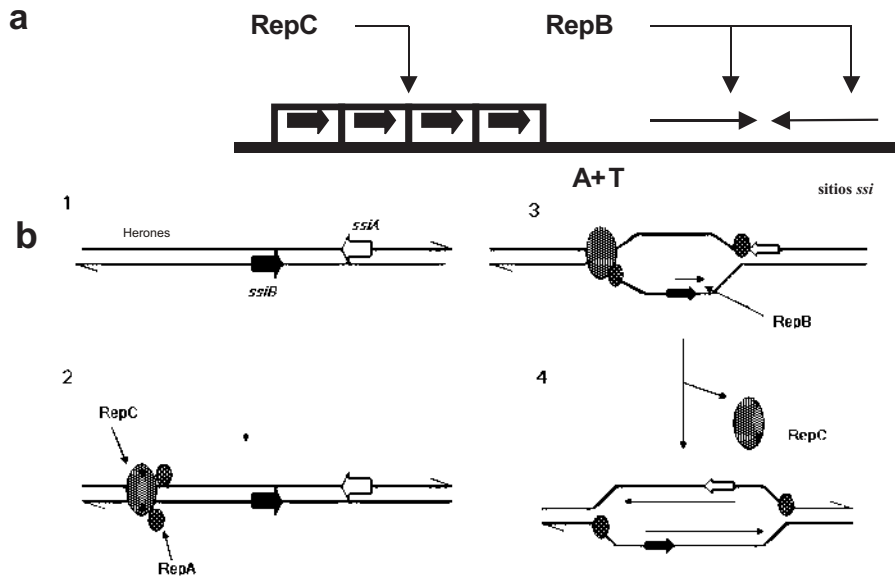


Figura 4. Características de la replicación por el mecanismo de desplazamiento de la cadena. a) Origen de replicación y regiones importantes en la replicación del plásmido pRSF1010 de *E. coli*. Se muestran las regiones de unión de la proteína Rep C (iterones); los sitios de interacción de Rep B (repeticiones invertidas *ssi*) y la región rica en A+T. b) Replicación por el mecanismo de desplazamiento de la cadena (Modelo propuesto en referencia 6). Los detalles del modelo se explican en el texto.

G+C de 28 pb y un segmento rico en A+T de 31 pb. Otras regiones importantes dentro del origen son los sitios *ssiA* y *ssiB*, los cuales son repetidos invertidos localizados en cadenas opuestas (Fig. 4a). Los iterones y la región rica en A+T facilitan la apertura de la doble cadena, mientras que los sitios *ssiA* y *ssiB* favorecen la formación de estructuras de tallo y asa, las cuales son específicamente reconocidas por la primasa (RepB), codificada por el plásmido, que sintetiza el oligonucleótido iniciador (15).

El proceso de replicación se lleva a cabo por la acción concertada de las proteínas RepA, RepB y RepC. También se requieren la ADN polimerasa III y las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (SSB). La primera etapa de este proceso involucra la unión de RepC a los iterones del origen de replicación. Posteriormente RepA, que muestra actividad de helicasa, se une a la región rica en A+T con lo cual se separan las cadenas de ADN activando los sitios *ssi* (Fig. 4b; etapas 1 a 2).

El inicio de la replicación puede

ocurrir de manera independiente en cualquiera de los sitios *ssi*, de tal manera que la replicación procede de forma continua con la helicasa RepA facilitando el desplazamiento de la cadena original no replicada. Se ha observado que una replicación continua en ambos sitios *ssi* en direcciones opuestas origina una estructura de ADN de doble cadena semejante a la formada en la replicación tipo theta (Fig. 4b; etapas 3 a 4). Por otra parte, puede ocurrir la síntesis desacoplada de ambas cadenas, lo cual permitiría la generación de moléculas de ADN superenrollado de doble cadena y de intermediarios de ADNcs. Estas moléculas de cadena sencilla pueden corresponder a cualquiera de las cadenas y por lo tanto podrían contener las secuencias *ssiA* o *ssiB*. La replicación de estos monómeros se inicia en el origen *ssi* expuesto, con lo que se sintetiza la cadena complementaria y los monómeros son convertidos a ADN de doble cadena. Debido a las actividades de las tres proteínas Rep codificadas por el plásmido, su replicación es independiente de los factores del

hospedero que participan en las primeras etapas del proceso, como la ARN polimerasa y las proteínas DnaA, DnaB y DnaC, entre otras (15).

Los plásmidos que se replican por el mecanismo de desplazamiento de la cadena, de manera similar a los plásmidos RC, son capaces de replicarse en una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, además de transferirse de manera eficiente. Como resultado del amplio rango de hospederos y de su movilidad, estos plásmidos son considerados promiscuos. Algunos vectores de clonación con estas características se han obtenido a partir de los plásmidos conjugativos RSF1010 y RP4, los cuales se replican en bacterias Gram negativas. Sin embargo, se ha establecido que los plásmidos de la familia IncQ y otros relacionados, muestran similitud en las secuencias de los iterones, con lo cual se han formado grupos de incompatibilidad (Tabla II). Esto trae como consecuencia una disminución en el número de copias o la segregación o curación de los plásmidos que tienen elementos de su maquinaria de replicación en común. Lo anterior representa un inconveniente para el uso de estos plásmidos en el diseño de vectores de clonación (14).

CONCLUSIONES

Los estudios sobre la replicación de los plásmidos bacterianos han revelado una variedad de factores, algunos codificados por el plásmido y otros por el hospedero, que son importantes para este proceso. El análisis de la replicación de estos elementos genéticos provee, por lo tanto, una ventana muy amplia para obtener información concerniente a la interacción entre el plásmido y el hospedero, y de esta manera entender la capacidad de algunos plásmidos para colonizar diferentes hospederos. Lo anterior puede tener implicaciones biotecnológicas importantes, por ejemplo, en la

búsqueda y caracterización de vectores de clonación de amplio rango de hospederos o vectores binarios, así como vectores de expresión con nuevas propiedades o

con características más eficientes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Carlos Cervantes Vega los comentarios y

sugerencias realizadas al manuscrito. Pedro D. Loeza recibe beca de la UMSNH para estudios de doctorado. El trabajo de los autores está financiado por el CONACYT (38746-B).

REFERENCIAS

- Khan S A (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 442-455.
- Romero D y Palacios R (1997) Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu Rev Genet* 31: 91-111.
- Khan S A (2000) Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol Microbiol* 37: 447-484.
- López-Meza J E (2001) Biología molecular de los plásmidos RC y su función en *Bacillus thuringiensis*. *Ciencia Nicolaita* 29: 23-30.
- Del Solar G, Alonso J C, Espinosa M y Diaz-Orejas R (1996) Broad-host-range plasmid replication: an open question. *Mol Microbiol* 21: 661-666.
- Scherzinger E, Haring V, Lurz R y Otto S (1991) Plasmid RSF10: DNA replication *in vitro* promoted by purified pRSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucleic Acids Res* 19: 1203-1211.
- Holtwick R, Wallbrunn V A, Keweloh H y Meinhardt F (2001) A novel rolling-circle-replication plasmid from *Pseudomonas putida* P8: molecular characterization and use as vector. *Microbiology* 147: 337-344.
- Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echeverría M, Espinosa M y Diaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 434-464.
- Andrup L, Jensen G B, Wilcks A, Smidt L, Hoflack L y Mahillon J (2003) The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmids from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. *Plasmid* 49: 205-232.
- Vocke C y Bastia D (1983) DNA-protein interaction at the origin of DNA replication of the plasmid pSC101. *Cell* 35: 495-502.
- Filutowicz M, Dellis S, Levchenko I, Urh M, Wu F y York D (1994) Regulation of replication in an iteron-containing DNA molecule. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 239-273.
- Bramhill D y Kornberg A (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54: 915-918.
- Marians K J (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 61: 673-719.
- Gardner N M, Deane M S y Rawlings D E (2001) Isolation of a new broad-host-range IncQ-like plasmid, pTC-F14, from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* and analysis of the plasmid replicon. *J Bacteriol* 183: 3303-3309.
- Sakai H y Komano T (1996) DNA replication of the IncQ broad-host-range plasmids in gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 377-382.