

EL BACTERIÓFAGO Ø29: HISTORIA DE UN MODELO

Margarita Salas

*Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM)
Universidad Autónoma de Madrid*

*Este artículo está dedicado a Roberto Marco, investigador,
docente y amigo, a quien siempre recordaré.*

Cuando en 1967 Eladio Viñuela y yo decidimos volver a España a tratar de desarrollar en nuestro país la Biología Molecular que habíamos aprendido en el laboratorio de Severo Ochoa, la primera cuestión que tuvimos que decidir fue el tema de trabajo que queríamos realizar en España. Pensamos que no deberíamos seguir con los temas en los que habíamos trabajado en el laboratorio de Ochoa, que eran muy competitivos, ya que éramos conscientes de que organizar un laboratorio e iniciar un grupo de investigación en España no iba a ser fácil. Habíamos asistido a un curso sobre virus bacterianos, también llamados bacteriófagos o fagos, en los laboratorios de Cold Spring Harbor.

Precisamente el estudio de los virus bacterianos había dado lugar al nacimiento de la Genética Molecular en los años 50 con el trabajo del llamado grupo de los fagos dirigido por Max Delbrück. Así pues, elegimos como sistema de trabajo un bacteriófago, no muy estudiado por entonces, de tamaño relativamente pequeño para poder estudiarlo en profundidad a nivel molecular, pero a la vez morfológicamente complejo.

El sistema modelo de elección fue el bacteriófago ø29 que infecta a la bacteria *Bacillus subtilis*, y cuyo DNA lineal de doble cadena tiene un tamaño de unos 19000 pares de bases, es decir, es unas 10 veces más pequeño que el mejor conocido fago T4 de *Escherichia coli*, con cuyo estudio se habían realizado grandes avances en Genética Molecular a partir de los años 50. Pero por otra parte, ø29 es estructuralmente complejo, formado por una cabeza, un cuello y una cola, lo que le hacía un modelo atractivo desde el punto de vista del estudio de la morfogénesis de la partícula viral, es decir, como se ensamblan las distintas proteínas que forman la estructura del virus para dar lugar al virus maduro.

Con nuestro primer doctorando, Enrique Méndez, estudiamos la estructura de la partícula viral y la caracterización de las diferentes proteínas que forman las distintas estructuras del fago, lo que dio lugar al primer trabajo del nuevo grupo, en la revista *Virology* (1), y también a la primera Tesis doctoral.

En paralelo, con Antonio Talavera primero y después con Felipe Moreno, Ana Camacho y Rafael Pérez Mellado, iniciamos el estudio de la genética del fago con el aislamiento de mutantes letales condicionales (sensibles a temperatura y sensibles a supresor) (2). Ello llevó al estudio de la morfogénesis de la partícula viral por parte de Fernando Jiménez, Ana Camacho, José L. Carrascosa y Nieves Villanueva. Lo más relevante fue el descubrimiento de la existencia de proteínas morfogenéticas, que forman parte transitoriamente de la partícula viral, pero no están presentes en el fago maduro (3,4).

Por otra parte, con Jesús Ávila, iniciamos el estudio de la transcripción del DNA del fago mediante la purificación y caracterización de la RNA polimerasa de la bacteria huésped de ø29, *B. subtilis*, identificando cuatro subunidades, beta', beta, alpha y sigma, las tres primeras implicadas en elongación y la última en iniciación de la transcripción (5). Posteriormente, con José Miguel Hermoso

demostramos la existencia de un control temporal en la transcripción del DNA del virus; los llamados genes tempranos se expresan al comienzo de la infección y los genes tardíos se transcriben posteriormente, y su expresión requiere un gen temprano, el gen 4.

En 1972, con Marta Rodríguez Inciarte y José M^a Lázaro utilizamos por primera vez una endonucleasa de restricción en España, la EcoRI, haciendo el primer mapa en el que se hacía la correlación del mapa físico y genético de ϕ 29 (6).

La llegada de la nueva tecnología de la Ingeniería Genética nos abrió nuevos caminos en el estudio del fago ϕ 29: el clonaje de genes para la sobreproducción de las proteínas correspondientes así como la mutagenesis dirigida para realizar estudios de correlación de estructura y función. Así, clonamos el gen 4 (7) y la proteína producida en cantidades altas se purificó y se desarrolló un sistema de transcripción *in vitro* en el cual la proteína p4 se requería para la transcripción del promotor tardío en presencia de la RNA polimerasa de *B. subtilis* (8). Demostramos que la proteína p4 es un activador transcripcional que se une a una secuencia invertida intrínsecamente curvada, produciendo al unirse un aumento en la curvatura del DNA (9,10). Este aumento en la curvatura del DNA, así como los contactos directos entre la proteína p4 y la RNA polimerasa son necesarios para la activación del promotor tardío.



Madrid, año 2000: Entrevista con Margarita Salas (publicada en el n° 4 de “Encuentros Multidisciplinares”). De izquierda a derecha: Roberto Marco, Margarita Salas y Jesús Lizcano

Posteriormente, demostramos que la misma proteína p4 que activa la transcripción tardía es un represor de dos promotores tempranos, A2b y A2c (11). Por otra parte, la proteína viral temprana producto del gen 6, que se requiere para la iniciación de la replicación del DNA viral, actúa como represora del promotor viral C2 localizado en el extremo derecho del DNA de ϕ 29. La proteína p6 también coopera con la proteína reguladora p4 en la activación del promotor tardío A3 y en la represión de los promotores tempranos A2b y A2c (12).

Más recientemente, en colaboración con el grupo dirigido por Miquel Coll en el Instituto de Biología Molecular de Barcelona del CSIC, hemos obtenido la estructura tridimensional de la proteína p4, así como la de la p4 unida al DNA (13), lo que nos ha abierto el camino para el estudio de las interacciones que tienen lugar entre la p4 y el DNA, así como de la p4 con otras proteínas como la RNA polimerasa y la p6.

El estudio de la replicación del DNA de $\phi 29$ surgió como consecuencia del descubrimiento por Juan Ortín de una proteína unida covalentemente a los extremos 5' del DNA que daba lugar a formas circulares que se convertían en DNA lineal de longitud unidad por tratamiento con enzimas proteolíticas (14). Por microscopía electrónica, José Manuel Sogo pudo visualizar dicha proteína, en los dos extremos del DNA de $\phi 29$. Dicha proteína, producto del gen 3 viral, se denominó proteína terminal (15).

También por microscopía electrónica caracterizamos los intermedios replicativos en bacterias infectadas por $\phi 29$ llegando a la conclusión de que la replicación se inicia en los extremos del DNA por un mecanismo de desplazamiento de cadena (16).

Posteriormente, en 1982, Miguel Ángel Peñalva demostró que la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$ tiene lugar utilizando la proteína terminal como “primer” (17). Esto ha supuesto el descubrimiento de un nuevo mecanismo para la iniciación de la replicación de genomas lineales.

Las dos proteínas esenciales para la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$ son la proteína terminal y la DNA polimerasa viral que forman inicialmente un heterodímero, y cuyos genes fueron clonados en *E. coli* para la sobreexpresión de las proteínas por Juan Antonio García y Luis Blanco, respectivamente (18,19) y su posterior purificación (20,21). Estas dos proteínas, una vez iniciada la replicación se separan, quedándose la proteína terminal unida covalentemente al DNA, y la DNA polimerasa prosigue la replicación dando lugar *in vitro* a DNA de $\phi 29$ de longitud unidad de un modo muy procesivo. Esto quiere decir que la DNA polimerasa, una vez que inicia la replicación de una cadena de DNA, continúa hasta el final, sin pararse ni disociarse. Además, la DNA polimerasa tiene una actividad intrínseca de desplazamiento de cadena (22).

En 1988, Cristina Garmendia realizó los primeros trabajos de mutagénesis dirigida en la proteína terminal de $\phi 29$ (23) y posteriormente, Luis Blanco, Antonio Bernad, María Antonia Blasco, Miguel de Vega y muchos otros doctorandos lo hicieron en la DNA polimerasa en un estudio de correlación de estructura y función (24).

Más recientemente, en colaboración con el grupo de Tom Steitz de la Universidad de Yale, se ha determinado la estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (25), siendo la primera vez que se determina la estructura de una polimerasa que utiliza una proteína terminal como iniciadora. Esto nos ha permitido profundizar en el estudio de la correlación de estructura y función, en particular determinar la estructura responsable de las propiedades de procesividad y desplazamiento de banda de la DNA polimerasa de $\phi 29$, que son únicas para esta polimerasa.

Por otra parte, Gil Martín y Crisanto Gutiérrez iniciaron el estudio de otra proteína implicada en el proceso de replicación, la proteína p5, caracterizada como una proteína de unión a DNA de cadena simple. Por microscopía electrónica se demostró su unión a la cadena simple desplazada en los intermedios replicativos del DNA de $\phi 29$ (26).

También me quiero referir de nuevo a la proteína p6, que se une a los orígenes de replicación del DNA de $\phi 29$ formando un complejo nucleoprotéico cuyo estudio inicial fue realizado por Ignacio Prieto y Manuel Serrano (27,28). Esta proteína estimula la iniciación de la replicación, probablemente favoreciendo la apertura de los extremos del DNA. De acuerdo con esta idea, se ha obtenido replicación *in vitro* de DNA de cadena simple, lo que llevó a Juan Méndez a demostrar que la

replicación se inicia en la timina que ocupa la segunda posición desde el extremo 3' y no en la timina que ocupa la primera posición (29). Esto, junto con el requerimiento de una reiteración terminal de al menos dos nucleótidos, nos ha llevado a postular un nuevo mecanismo que hemos llamado de deslizamiento hacia atrás o "sliding back". Este modelo tiene implicaciones importantes para mantener intactos los extremos del DNA de $\phi 29$. Nosotros proponemos que este modelo es extrapolable a otros DNAs que utilizan proteína terminal pues en todos estos casos existe reiteración en los extremos del DNA.

Otras dos proteínas virales que se requieren en la replicación del DNA de $\phi 29$, la p1 y la p16.7, cuyo estudio iniciaron Alicia Bravo y Wilfried Meijer, respectivamente, son proteínas de membrana que intervienen en la localización del DNA viral y de los intermedios replicativos en la membrana bacteriana (30,31).

Otra proteína viral, la p56, estudiada por Gemma Serrano, interacciona con la uracil-DNA glicosilasa bacteriana y evita la inestabilidad del DNA de $\phi 29$ cuando se incorporan residuos de uracilo al mismo (32).

También quisiera resaltar el papel de proteínas de *B. subtilis* como las del citoesqueleto, que se requieren para la replicación del DNA de $\phi 29$ (33), de acuerdo con el estudio de Daniel Muñoz, o la proteína Spo0A, estudiada por Wilfried Meijer y Virginia Castilla, que interfiere con la replicación y la transcripción del DNA de $\phi 29$ en bacterias que empiezan la fase de esporulación (34,35).

Finalmente, quisiera acabar con un aspecto práctico del sistema de replicación *in vitro* del DNA de $\phi 29$, que da lugar a amplificación del DNA. En presencia de las cuatro proteínas de replicación esenciales, la proteína terminal, la DNA polimerasa, la p5 y la p6, cantidades pequeñas de DNA de $\phi 29$ se amplifican unas 1000 veces dando lugar a la síntesis *in vitro* de DNA de unidad de longitud. El DNA amplificado *in vitro* es tan infectivo como el DNA aislado de partículas virales cuando se transfectan células competentes de *B. subtilis* (36).

Esto puede ser la base para un sistema de amplificación *in vitro* usando los orígenes de replicación y las proteínas de replicación de $\phi 29$. Por otra parte, la actividad de desplazamiento de cadena, unida a la procesividad y a la capacidad de corrección de errores de replicación de la DNA polimerasa de $\phi 29$ han dado lugar a una aplicación biotecnológica con unos excelentes resultados en la amplificación de DNA circular con iniciadores múltiples mediante el mecanismo llamado de la rueda giratoria (37). Más recientemente, se ha extendido la aplicación biotecnológica a la amplificación de DNA genómico lineal (38).

Quiero resaltar el hecho de que de un trabajo fundamentalmente básico pueden derivarse aplicaciones, como la DNA polimerasa de $\phi 29$, cuyas propiedades son únicas para la amplificación de DNA. También quiero resaltar que nuestros estudios de replicación con el DNA de $\phi 29$ son un modelo extrapolable a otros virus de interés sanitario y económico, como el adenovirus humano, el virus de la poliomielitis, el de la encefalomiocarditis, los virus de la hepatitis B y C, y una variedad de virus de plantas. Todos estos virus tienen proteína terminal unida covalentemente a los extremos 5' de su ácido nucleico e inician la replicación por un mecanismo similar al de $\phi 29$ (39).

BIBLIOGRAFÍA

1. E. Méndez, G. Ramírez, M. Salas and E. Viñuela (1971). Structural proteins of bacteriophage $\phi 29$. *Virology*, 45, 567-576.
2. R.P. Mellado, F. Moreno, E. Viñuela, M. Salas, B.E. Reilly and D.L. Anderson (1976). Genetic analysis of bacteriophage $\phi 29$ of *Bacillus subtilis*: Integration and mapping of reference mutants of two collections. *J. Virol.*, 19, 495-500.

3. A. Camacho, F. Jiménez, J. de la Torre, J.L. Carrascosa, R.P. Mellado, C. Vásquez, E. Viñuela and M. Salas (1977). Assembly of *B. subtilis* phage ϕ 29. I. Mutants in the cistrons coding for the structural proteins. *Eur. J. Biochem.*, 73, 39-55.
4. F. Jiménez, A. Camacho, J. de la Torre, E. Viñuela and M. Salas (1977). Assembly of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. II. Mutants in the cistrons coding for the nonstructural proteins. *Eur. J. Biochem.*, 73, 57-72.
5. J. Avila, J.M. Hermoso, E. Viñuela and M. Salas (1970). Subunit composition of *B. subtilis* RNA polymerase. *Nature*, 226, 1244-1245.
6. M.R. Inciarte, J.M. Lázaro, M. Salas and E. Viñuela (1976). Physical map of bacteriophage ϕ 29. *Virology*, 74, 314-323.
7. R.P. Mellado and M. Salas (1982). High level synthesis in *Escherichia coli* of the *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 proteins p3 and p4 under the control of phage lambda P_L promoter. *Nucl. Acids Res.*, 10, 5773-5784.
8. I. Barthelemy, J.M. Lázaro, E. Méndez, R.P. Mellado and M. Salas (1987). Purification in an active form of the phage ϕ 29 protein p4 that controls the viral late transcription. *Nucl. Acids Res.*, 15, 7781-7793.
9. I. Barthelemy and M. Salas (1989). Characterization of a new prokaryotic transcriptional activator and its DNA recognition site. *J. Mol. Biol.*, 208, 225-232.
10. F. Rojo, A. Zaballos and M. Salas (1990). Bend induced by the phage ϕ 29 transcriptional activator in the viral late promoter is required for activation. *J. Mol. Biol.*, 211, 713-725.
11. F. Rojo, M. Mencía, M. Monsalve and M. Salas (1998) Transcription activation and repression by interaction of a regulator with the α subunit of RNA polymerase: the model of phage ϕ 29 protein p4. *Progress Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 60, 29-46.
12. M. Elías-Arnanz and M. Salas (1999) Functional interactions between a phage histone-like protein and a transcriptional factor in regulation of ϕ 29 early-late transcriptional switch. *Genes Dev.* 13, 2502-2513.
13. D. Badía, A. Camacho, L. Pérez-Lago, C. Escandón, M. Salas and M. Coll. (2006). The structure of ϕ 29 transcription regulator p4-DNA complex reveals a novel DNA binding motif. *Mol. Cell.* 22, 73-81.
14. J. Ortín, E. Viñuela, M. Salas and C. Vásquez (1971). DNA-protein complex in circular DNA from phage ϕ 29. *Nature New Biology*, 234, 275-277.
15. M. Salas, R.P. Mellado, E. Viñuela and J.M. Sogo (1978). Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *J. Mol. Biol.*, 119, 269-291.
16. M.R. Inciarte, M. Salas and J.M. Sogo (1980). The structure of replicating DNA molecules of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *J. Virol.*, 34, 187-190.
17. M.A. Peñalva and M. Salas (1982). Initiation of phage ϕ 29 DNA replication *in vitro*: Formation of a covalent complex between the terminal protein, p3, and 5'-dAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5522-5526.
18. J.A. García, R. Pastrana, I. Prieto and M. Salas (1983). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for the protein linked to the ends of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 DNA. *Gene*, 21, 65-76.
19. L. Blanco, J.A. García and M. Salas (1984). Cloning and expression of gene 2, required for the protein-primed initiation of the *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 DNA replication. *Gene*, 29, 33-40.
20. Prieto, J.M. Lázaro, J.A. García, J.M. Hermoso and M. Salas (1984). Purification in a functional form of the terminal protein of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1639-1643.
21. L. Blanco and M. Salas (1984). Characterization and purification of a phage ϕ 29 coded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5325-5329.
22. L. Blanco, A. Bernad, J.M. Lázaro, G. Martín, C. Garmendia and M. Salas (1989). Highly efficient DNA synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.*, 264, 8935-8940.

23. C. Garmendia, M. Salas and J.M. Hermoso (1988). Site-directed mutagenesis of bacteriophage ϕ 29 terminal protein: isolation and characterization of a Ser₂₃₂ thr mutant in the linking site. *Nucl. Acids Res.*, 16, 5727-5740.
24. L. Blanco and M. Salas (1996). Relating structure to function in ϕ 29 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 271, 8509-8512.
25. S. Kamtekar, A. Berman, J. Wang, J.M. Lazaro, M. de Vega, L. Blanco, M. Salas and T. A. Steitz. (2004). Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage ϕ 29. *Mol. Cell* 16, 609-618.
26. C. Gutiérrez, G. Martín, J. M. Sogo and M. Salas (1991). Mechanism of stimulation of DNA replication by bacteriophage ϕ 29 SSB protein p5. *J. Biol. Chem.* 266, 2104-2111.
27. I. Prieto, M. Serrano, J.M. Lázaro, M. Salas and J.M. Hermoso (1988). Interaction of the bacteriophage ϕ 29 protein p6 with double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 314-318.
28. M. Serrano, M. Salas and J.M. Hermoso (1990). A novel nucleoprotein complex at a replication origin. *Science*, 248, 1012-1016.
29. J. Méndez, L. Blanco, J.A. Esteban, A. Bernad and M. Salas (1992). Initiation of ϕ 29 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: a sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9579-9583.
30. A. Bravo and M. Salas (1997). Initiation of bacteriophage ϕ 29 DNA replication *in vivo*: Assembly of a membrane-associated multiprotein complex. *J. Mol. Biol.* 269, 102-112.
31. W. Meijer, P.J. Lewis, J. Errington and M. Salas (2000) Dynamic relocalization of phage ϕ 29 DNA during replication and the role of the viral protein p16.7. *EMBO J.* 19, 4182-4190.
32. G. Serrano-Heras, A. Bravo and M. Salas. (2008). Phage ϕ 29 protein p56 prevents viral DNA replication impairment caused by uracil excision activity of uracil-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105, 19044-19049.
33. D. Muñoz-Espín, R. Daniel, Y. Kawai, R. Carballido-López, V. Castilla-Llorente¹, J. Errington, W. J.J. Meijer and M. Salas (2009). The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral DNA replication in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106, 13347-13352.
34. W.J.J. Meijer, V. Castilla-Llorente, L. Villar, H. Murray, J. Errington, and M. Salas (2005). Molecular basis for the exploitation of spore formation as survival mechanism by virulent phage ϕ 29. *EMBO J.* 24, 3647-3657.
35. V. Castilla-Llorente, D. Muñoz-Espín, L. Villar, M. Salas and W.J.J. Meijer. (2006). SpoOA, the key transcriptional regulator for entrance into sporulation, is an inhibitor of DNA replication. *EMBO J.* 25, 3890-3899.
36. L. Blanco, J.M. Lázaro, M. de Vega, A. Bonnin and M. Salas (1994) Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12198-12202.
37. F.B. Dean, J.R. Nelson, T.L. Giesler and R.S. Lasken, (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using ϕ 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 11, 1095-1099.
38. F.B. Dean, S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A.F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S.F. Kingsmore, M. Egholm and R.S. Lasken (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5261-5266.
39. M. Salas. (2007) 40 years with bacteriophage ϕ 29. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 1-22.