



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

**EFFECTO DEL RETRO-REGULADOR sib EN EL DESARROLLO
LÍTICO DEL BACTERIOFAGO LAMBDA**

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

ROSA LAURA CAMARENA MEJIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS-IPN,
EN EL LABORATORIO DEL DR. GABRIEL GUARNEROS PEÑA

A MI MADRE

por su ilimitado amor
para educar y apoyar
a la "oveja negra" de
la familia

A LA MEMORIA DE MI PADRE †

Porque el amor es la forma más profunda del trabajo humano,
donde la lucha es el construir compartido y consciente.

A CARLOS FERNANDEZ
por su total apoyo a lo largo del tiempo,
por todo nuestro amor,
simple y complicadamente...
Gracias por todo

A MI FAMILIA

A todos los que participan en mi formación profesional, humana y política...
Porque nuestro reto es encontrar el camino para convertir en gritos los murmullos, con una fe inquebrantable en el futuro.

Agradezco:

Al Dr. Gabriel Guarneros por sus enseñanzas y haber fomentado en mí el sentido crítico y la disciplina tan necesarios en este "negocio"

A la Compañía Avon Cosmetics por su apoyo económico

A mis compañeros de laboratorio

Al Sr. Arnulfo Zarco, por la preparación del material del presente trabajo

A mis profesores

A mis amigos (ellos saben quienes son)

Tabla de Abreviaturas.....	I
INTRODUCCION	1
MATERIAL	24
Cepas	24
Medios de Cultivo.....	24
Soluciones.....	25
METODOS.....	29
Propagación de bacteriófagos por	
Infección en medio líquido.....	29
Propagación de bacteriófago por	
capa confluyente.....	29
Obtención de bacteriófagos	
recombinantes.....	29
Inactivación de bacteriófagos por	
tratamiento con agentes quelantes.....	29
Obtención de cepas lisogénicas.....	30
Crecimiento en un ciclo.....	30
Tasa de eclosión.....	31
Inducción de una cepa lisogénica.....	31
Ensayo de superinfección.....	31
Prueba del tapiz mixto.....	32
Prueba de complementación.....	32
Obtención de suspensiones de	
bacteriófagos con alto título.....	33
Ensayo para determinar sensibilidad a	
la irradiación ultravioleta.....	33
Obtención de células irradiadas para	
incorporación de aminoácidos radioactivos.....	34
Incorporación de precursores radioactivos	
en células irradiadas.....	34
Análisis de las proteínas sintetizadas	
por lambda en células irradiadas.....	35
RESULTADOS	37

Construcción de bacteriófagos.....	37
Obtención de los fagos λ_{red114} c_{I857} c_{II41} y	
λ_{sibl} $red114$ c_{I857} c_{II41}	37
Obtención de los fagos λ_{red114} c_{I857} y	
λ_{sibl} $red114$ c_{I857}	40
Obtención de los fagos $\lambda_{HindIII\Delta}$ $red114$ c_{I857} y	
$\lambda_{HindIII\Delta}$ $sibl$ $red114$ c_{I857}	43
Estudio del desarrollo lítico en	
condiciones λ_{sib}^+ y λ_{sibl}	46
Ensayos de tasa de eclosión.....	46
Inducción de lisógenas.....	49
Crecimiento en un ciclo.....	51
Estudio del desarrollo lítico en	
condiciones $\lambda_{HindIII\Delta}$ sib^+ y $\lambda_{HindIII\Delta}$ $sibl$	51
Prueba de complementación.....	56
Análisis electroforético de las proteínas	
del bacteriófago lambda.....	56
Identificación de las proteínas	
codificadas en la región <u>b</u>	59
Análisis de las proteínas de la región <u>b</u> sintetizadas	
en condiciones λ_{sib}^+ y λ_{sibl}	65
DISCUSION.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	74

A B R E V I A T U R A S

- bio - operón para la biosíntesis de biotina.
- DMSO - dimetil sulfóxido.
- D.O. - densidad óptica.
- EDTA - etilen-diamino tetraacetato de sodio.
- gal - operón para la utilización de galactosa.
- mCi - milicurios.
- m.d.i. - multiplicidad de infección.
- PEG - polietilen glicol.
- p.g. - producto de gen.
- PPO - 2'5' difeniloxazol.
- rpm - revoluciones por minuto.
- SDS - dodecil sulfato de sodio.
- TEMED - N, N, N', N'' - tetrametil etilén diamina.
- TCA - ácido tricloracético.
- u.f.p. - unidades formadoras de placa.

I N T R O D U C C I O N

Los sistemas vivos altamente organizados obedecen a complejos mecanismos de regulación que dan por resultado una expresión coordinada de los diferentes programas de respuesta, esta complejidad ha hecho necesario el uso de modelos sencillos, tales como bacterias y virus, con el fin de tratar de explicar cómo puede ocurrir la regulación en organismos superiores.

El bacteriófago lambda aislado por Lederberg (1951) presenta una serie de características que le permiten ser un modelo adecuado para estudios tales como: morfogénesis, regulación genética, recombinación sitio-específica y recombinación generalizada. Recientemente λ ha sido utilizado con gran éxito como vehículo para clonar genes procarióticos y eucarióticos (Enquist y Szybalsky 1978; Williams y Blattner 1980).

Las partículas maduras del bacteriófago lambda están compuestas de iguales cantidades de proteína y DNA (Hershey y Dove 1971). Cada fago contiene una molécula de DNA de doble cadena de 31×10^6 daltones (cerca de 46,500 pares de bases), encapsulada en una cabeza icosaédrica de cerca de 50nm de diámetro y una cola tubular de 150nm de largo (Kellenberg y Edgard 1971; Lewin B. 1977).

El desarrollo del bacteriófago lambda comienza cuando una partícula se adsorbe por el extremo de su cola a los receptores de la célula huésped (*E. coli*) (Bmr et al., 1978) e inyecta su molécula de DNA, la cual codifica aproximadamente para 50 proteínas (Figura 1). Como podemos observar, el mapa de lambda comprende agrupamientos de genes que codifican para funciones relacionadas, por ejemplo: los genes A W B C Nu₃ D E F1 F11 y Z codifican para las proteínas estructurales de la cabeza; U V G T H M L K e I corresponden a los genes de las proteínas estructurales de la cola; los productos de los genes int xis red α red β y gam son necesarios para las funciones de recombinación; cIII, N, cI, cro y cII están involucrados en diferentes mecanismos regulatorios; O y P en la replicación del DNA y S y R en la lisis celular (Herskowitz y Hagen 1980). Esto permite que durante el desarrollo del fago, los genes que son necesarios juntos pueden ser expresados coordinadamente a través de un número determinado de controles transcripcionales. Sin embargo durante el crecimiento de lambda, estos genes no se

Figura 1 - Mapa genético del bacteriófago lambda.

Se muestran los más probables marcos de lectura para las proteínas. Las flechas arriba de los genes muestran las principales direcciones de transcripción y traducción. - Los genes en los recuadros de abajo de la línea son traducidos de izquierda a derecha, aquellos que se traducen de derecha a izquierda se esquematizan arriba de la línea. Las líneas punteadas indican los mas especulativos marcos de lectura. Cuando ningún gen o proteína se asigna a los marcos de lectura abierta se da un número que corresponde al número de residuos de aminoácidos de la posible proteína que contienen (Sanger F., et. al., 1982).

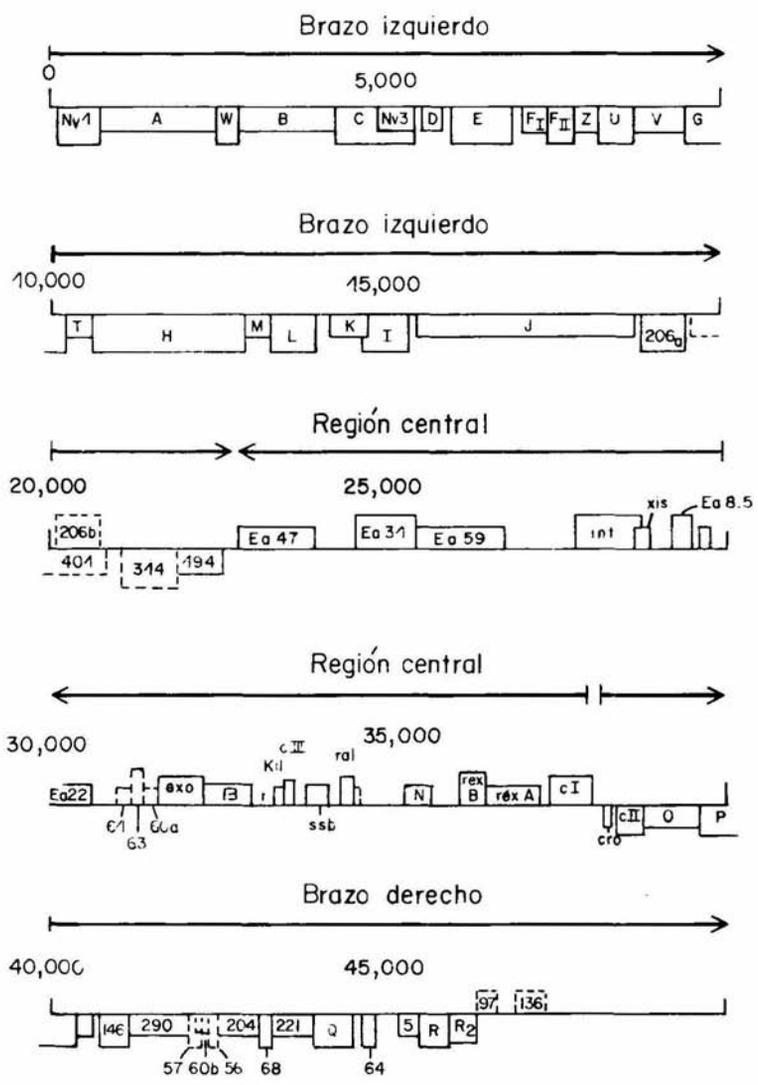


Figura 1

expresan continuamente, la infección por lambda resulta en la transcripción secuencial de estos genes determinada por la síntesis secuencial de proteínas regulatorias. Si bien, ciertos circuitos de control son obligatorios, lambda realiza una elección durante la infección para seguir la vía lítica o la vía lisogénica.

Durante el crecimiento lítico, común a fagos temperados o virulentos, el cromosoma del virus es usualmente replicado varias veces, estos genomas son empacados dentro de cápsidas virales hechas a partir de las proteínas codificadas por el fago, conduciendo a la muerte celular y a la liberación de aproximadamente 100 fagos por bacteria infectada (Weisberg 1977). Únicamente los virus temperados son capaces de vivir en armonía con el huésped. Lambda es el mejor estudiado de los virus temperados, la respuesta lisogénica ocurre a través de la síntesis de un represor codificado por el gen cI, que inhibe la expresión de los genes virales, y el producto del gene int -- que promueve la inserción del cromosoma viral en el cromosoma bacteriano. La célula resultante se denomina lisógena y al cromosoma del virus integrado se le llama profago (Echols H. 1972; Herskowitz 1980) (Figura 2). Este profago es replicado como parte del cromosoma del huésped y es heredado por las células hijas durante la división celular. Un profago inicia el crecimiento lítico cuando la represión falla. Este proceso llamado inducción, -- consiste en que el profago es escindido del cromosoma del huésped por la -- reacción inversa a la integración, requiriendo de los productos de los genes int y xis (Guarneros y Echols 1973), produciendo la lisis celular y la producción de progenie.

Cuando el DNA del fago entra en la célula se circulariza por los extremos cohesivos (Yarmolinsky 1971) y se inicia la transcripción inmediata a partir de los promotores P_L y P_R localizados justo a la izquierda y derecha -- del gen cI (Heinemann y Spiegelman 1970). Los RNA's mensajeros resultantes terminan al final de los genes N y cro en los sitios t_L, t_{R1} y t_{R2} (Roberts 1969). El transcrito izquierdo codifica para la proteína N cuya acción es -- esencial para la siguiente fase de infección, ya que el producto del gen N modifica la maquinaria transcripcional de tal modo que los terminadores t_L, t_{R1} y t_{R2} ya no son efectivos para la terminación y entonces la transcripción procede hacia los genes tempranos no inmediatos (Heinemann y Spiegelman

Figura 2 - Modelo de Campell para la integración - escisión

El genoma del bacteriófago lambda circularizado por los extremos cohesivos permite que el sitio PP' (attP) interactue con el sitio BB' en el cromosoma bacteriano, - un simple entrecruzamiento recíproco ocurre entre estos sitios, requiriendo exclusivamente del producto del gene int. El fago inserto en el cromosoma bacteriano tiene una secuencia lineal y está flanqueado por los sitios --BP' y PB'. La reacción inversa, escisión, involucra la recombinación entre los sitios híbridos y requiere del producto del gene int y del producto del gene xis.

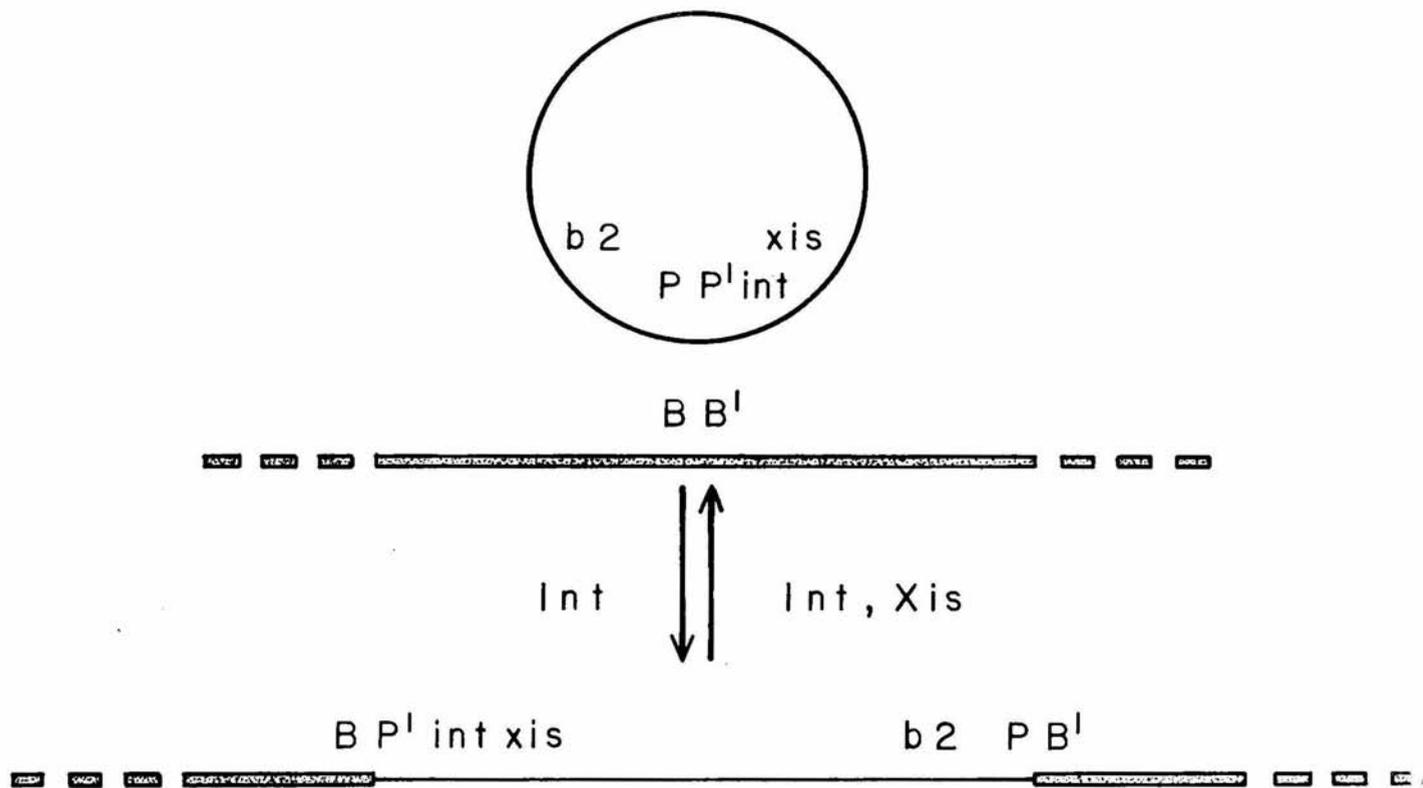


Figura 2

1971; Lozeron et al., 1976).

La proteína N reconoce sitios determinados en el DNA, llamados nut_L (utilización de N) (Salatrom y Szybalsky 1978) y nut_R (Rosenberg et al., 1978; De Crombrughe et al., 1979), en los cuales N interactúa favoreciendo el fenómeno anti-terminación en estos tres terminadores rho-dependientes (Holmes 1983) permitiendo la elongación del mensajero (Figura 3).

Aún no es claro el mecanismo de acción de N para llegar a cabo la anti-terminación, ni las posibles interacciones entre la proteína N y los sitios de utilización de N, la RNA polimerasa, etc. Pero es conocido que existen proteínas del huésped, tales como Nus A, Nus B, Nus C y Nus E que participan en los eventos de antiterminación (Friedman et al., 1973, 1976 y 1981); la proteína Nus A, está involucrada directamente en antiterminación y se ha postulado que quizá permite la unión del pg N a la RNA polimerasa; el pg Nus E codifica para la proteína ribosomal S 10 y se ha sugerido la participación de los ribosomas en este fenómeno; se sabe que mutaciones de Nus D (rho) interfieren en la antiterminación. Debido a todas estas características podemos darnos cuenta de que el fenómeno de antiterminación es muy complejo e involucra un gran número de factores, cuyo papel aún no ha sido completamente dilucidado (Holmes 1983).

Una vez elongados los transcritos provenientes de P_L y P_R se cuenta con una cantidad importante de las proteínas c_{II} , c_{III} y cro . Los productos de los genes c_{II} y c_{III} actúan en c_y permitiendo la transcripción de P_{RE} (Reichard y Kaiser 1971) hacia el gen c_I (represor), en dirección opuesta a la transcripción originada en P_R , este último promotor controla la expresión de las funciones líticas; este es por lo tanto, un sistema de transcripción convergente. Se ha pensado que este sistema juega un papel importante en la decisión lisis-lisogenia, observándose que la transcripción a partir de P_{RE} provoca una disminución en la expresión de las funciones líticas, esto es, las funciones controladas por P_R (Court et al., 1975; McMacken et al., 1970). Ward (1979), sugirió que si por alguna razón P_{RE} es más fuerte que P_R , la transcripción izquierda predomina con el consecuente establecimiento de la represión (Figura 4).

Aunado a este mecanismo de transcripción convergente existe un fino --

Figura 3 - Diagrama esquemático de la regulación genética del bacteriófago lambda.

Los cuadros arriba del mapa indican la localización de genes o sitios en el DNA involucrados en la regulación genética.

- (•) Sitios promotores.
- ($\leftarrow\rightarrow$) Productos de transcripción.
- (t_L , t_{R1} , t_{R2}) Las localizaciones de los terminadores rho dependientes.
- (N) El producto del gene N, el cual previene la terminación.
- (Q) El producto del gene Q, un regulador positivo de la transcripción tardía.
- ($\leftarrow\rightarrow$) Transcritos que codifican productos genéticos involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia.

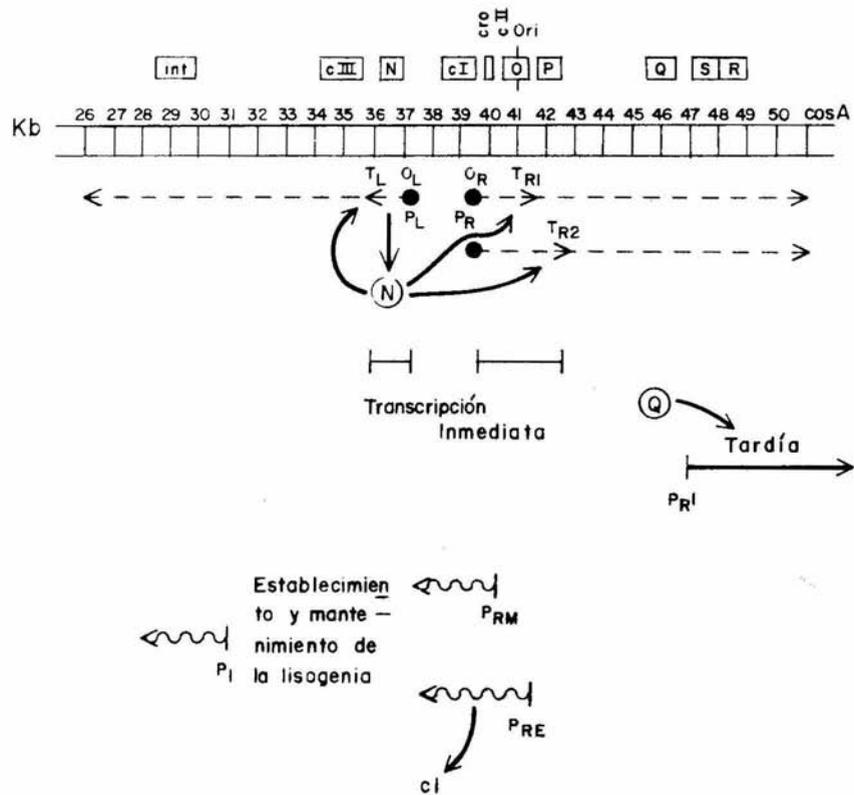


Figura 3

Figura 4 - Transcripción convergente entre los promotores P_R
y P_{RE} .

En la figura se esquematiza la dirección de la transcripción de los promotores P_R y P_{RE} , mostrando como el sistema de transcripción convergente puede influir sobre la decisión lisis - lisogenia.

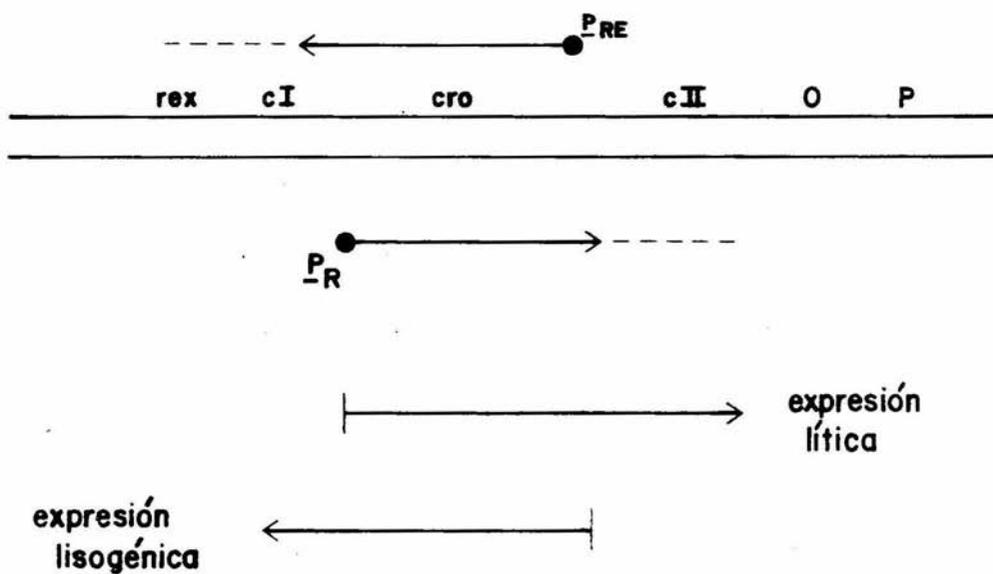


Figura 4

control para la decisión de lisis-lisogenia en la zona del operador O_R al cual se unen las proteínas cI y Cro, regulando la transcripción con consecuencias diferentes: cI bloquea el crecimiento lítico, mientras Cro es esencial para dicho crecimiento, la razón de esta diferencia es por que el operador O_R posee tres sitios de unión a los cuales Cro y cI se unen con diferente afinidad relativa, controlando así la iniciación de la transcripción de P_R y P_{RM} (Patashne 1980) (Figura 5). Tanto cI como Cro pueden reprimir la transcripción de P_R y P_L , cI reprime la transcripción de estos promotores en estado lisogénico y Cro los reprime en cierto momento del ciclo lítico (Echols y Green 1971; Reichard 1975; Reichard y Kaiser 1971) por medio de su unión a la zona operadora (O_{L1} , O_{L2} , O_{L3} , y O_{R1} , O_{R2} , y O_{R3}) de P_L y P_R .

Se sabe que P_{RM} es activado y P_R es reprimido cuando cI se encuentra unido a O_{R1} y O_{R2} , bloqueando el acceso de la RNA polimerasa al promotor P_R (Meyer y Patashne 1981), P_{RM} es reprimido cuando cI se encuentra unido a O_{R1} , O_{R2} y O_{R3} ocurriendo esto a solo altas concentraciones de cI (de 5 a 15 veces la concentración presente en las lisógenas) (Maurer et al., 1980). Aparentemente la unión de cI a O_{R1} y O_{R2} facilita la unión de la RNA polimerasa a P_{RM} quizá de manera análoga a otras proteínas más activadoras (Meyer 1980; Meyer y Patashne 1978).

La proteína Cro posee una afinidad relativa opuesta a cI ($O_{R3} > O_{R2} > O_{R1}$) (Johnson 1978; Takeda 1979) consecuentemente el efecto de Cro en la transcripción de P_R y P_{RM} es opuesto al de cI. La transcripción de P_{RM} es reprimida a bajas concentraciones de Cro, correspondiente a la unión de Cro a O_{R3} ; a altas concentraciones de Cro, se reprime la transcripción de P_R por unión a O_{R3} , O_{R2} y O_{R1} . Entonces, en la ejecución lisis-lisogenia la acción de Cro y cI son mutuamente exclusivas; cI reprime la síntesis de Cro o Cro reprime la síntesis de cI.

Como podemos observar en la zona central del DNA de lambda se dan complejos circuitos de control que determinan la decisión lisis-lisogenia, sin embargo existen factores del huésped y factores ambientales como temperatura, multiplicidad de infección, etc. que influyen en esta decisión (Kourilsky 1973).

Figura 5 - Estructura de la región O_R .

El genoma de lambda entre los genes ci y cro se ilustra esquemáticamente con las posiciones relativas de los sitios de unión de ci y Cro (O_{R1} , O_{R2} , O_{R3}) y los promotores P_R y P_{RM} .

Las zonas indicadas con líneas discontinuas representan los sitios de reconocimiento de la RNA polimerasa para estos -- promotores y las flechas indican la dirección de la transcripción de los mismos.

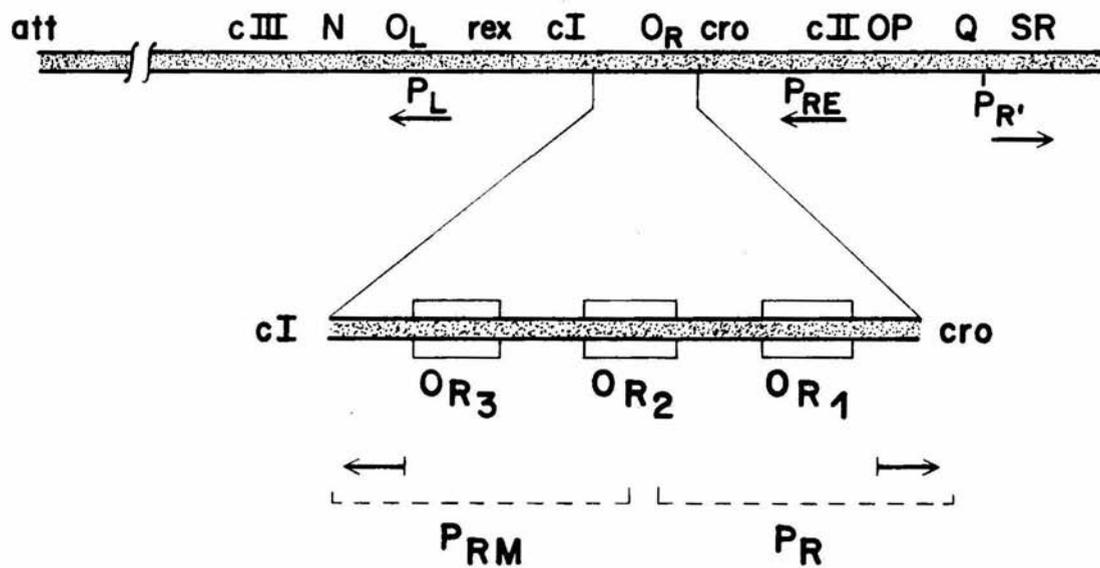


Figura 5

Si el bacteriófago lambda sigue la vía lítica Cro se une a P_L y P_R , por este tiempo suficientes cantidades de la proteína Q han sido sintetizadas y provocan la transcripción de los genes tardíos, ya que estimula la transcripción a partir del promotor P_R . Las proteínas O y P se requieren para activar el origen de replicación (ori) y las demás proteínas tardías se requieren para la lisis celular y el empaquetamiento de las moléculas de DNA (Dove et al., 1969; Furth et al., 1977).

Si lambda no sigue la vía lítica, la célula huésped puede convertirse en una lisógena; para el establecimiento de este estado se requiere la coordinación entre la integración del genoma del fago en el genoma del huésped por la integrasa y de la represión de los promotores P_L y P_R por el represor cI (Figura 6).

La proteína represora (cI) es transcrita primeramente del promotor P_{RE} (Reichard y Kaiser 1971) y una vez establecida la lisogenia se transcribe del promotor P_{RM} (Yen y Gussin 1973). El gene int, cuyo producto es necesario para la integración del DNA de lambda en el genoma bacteriano, puede ser transcrito a partir del promotor P_L y a partir de P_I (Katzir 1976; Singer 1970). Los dos promotores que controlan la lisogenia P_{RE} y P_I son regulados positivamente por las proteínas cII y cIII (Katzir 1976; Court et al., 1977) haciendo esto posible la síntesis coordinada del represor y la integrasa.

La transcripción de la integrasa está sujeta entonces a la expresión de los promotores P_I y P_L , el primero produce un RNAm dependiente de las proteínas cII y cIII y termina en t_L (Oppenheim 1978); el RNAm proveniente de P_I se extiende hacia la región b (Adhya et al., 1976), esto es, trasciende a t_I y se ha observado que en este mensajero la región correspondiente a la porción de DNA que codifica para int se encuentra disminuida en períodos tempranos de infección con respecto a la región transcrita a la derecha, lo cual sugiere que en esta región la transcripción es ineficiente o que el mensajero se degrada (Salstrom y Szybalsky 1978).

En este sentido, posteriormente se demostró que en la región b del bacteriófago lambda existe un sitio inhibidor de la recombinación integrativa, $PP' \times BB'$. Esto es, un fago cII⁻ no puede promover la recombinación -

Figura 6 - Control de las vías lítica y lisogénica.

- 1) Expresión de los genes tempranos inmediatos: los genes N y cro son transcritos y traducidos.
- 2) Expresión de los genes tempranos no inmediatos:
La proteína N actúa elongando los mensajeros de P_L y P_R . Esto produce las proteínas cII, cIII e Int, necesarias para la lisogenia y también se producen las proteínas O, P y Q, necesarias para el desarrollo lítico.
- 3) Establecimiento del estado lisogénico (Izquierda) vs. - desarrollo lítico (Derecha).

A la izquierda, cII y cIII estimulan la producción de la proteína cI.

En el desarrollo lítico Cro reprime la transcripción de los promotores tempranos, mientras Q permanece presente.
- 4) A la izquierda se ilustra el mantenimiento del estado lisogénico, donde sólo cI es transcrito y traducido.

A la derecha la proteína Q estimula la transcripción tardía y por lo tanto la producción de partículas fágicas.

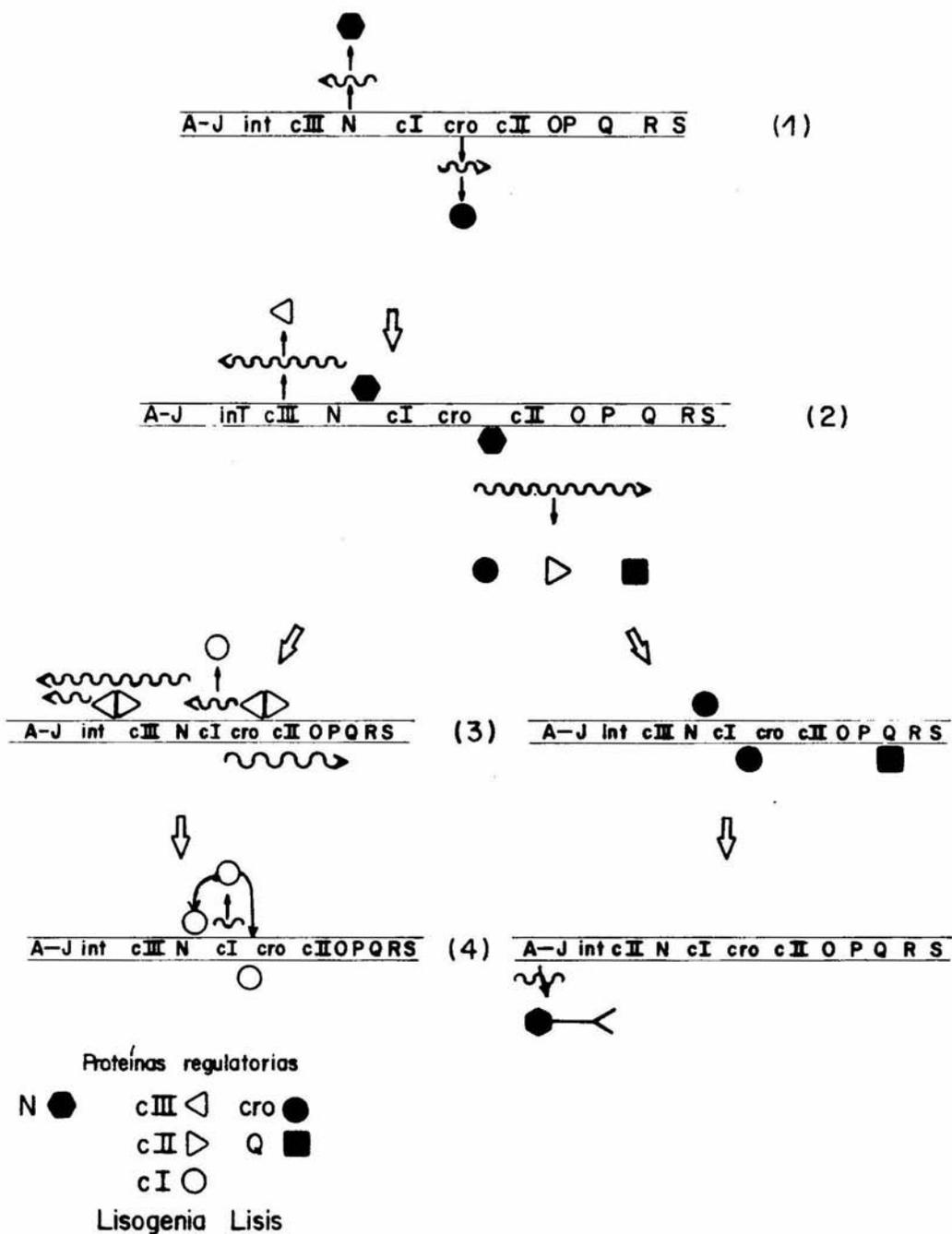


Figura 6

catalizada por Int, mientras un fago b Δ_2 cII⁻ es capaz de eliminar el efecto fenotípico Int⁻ de la mutación cII (Guarneros y Galindo 1979). Análisis de complementación demostraron que la región b debe encontrarse en cis con respecto a int para observar el efecto inhibitorio, este efecto inhibitorio se observa únicamente sobre el mensajero proveniente de P_L (Epp et al., 1981; Guarneros y Galindo 1979).

Esto sugirió entonces la presencia de un sitio inhibitorio en la región b el cual disminuye en cis la expresión de int, esto es, no es un producto difusible sino una región a la cual se le denominó como sib (sitio inhibitorio de la región b). Por mapeo funcional sib se localiza dentro de los -250 pb a la izquierda del sitio de integración.

Debido a la novedosa característica de regulación de sib, en la cual el sitio regulatorio se localiza hacia el extremo 5' del gene que regula, a dicho fenómeno se le conoce con el nombre de retro-regulación (Gottesman 1982; Guarneros 1982; Shindler 1981).

Guarneros et al. (1982), reportó la exacta localización de sib basado en la secuencia de mutaciones puntuales, que provocan la desaparición del efecto inhibitorio, esto es, llevan a cabo eficientemente la recombinación integrativa. Las mutaciones sib se localizan a -158pb, -163pb y 194pb para sib1, sib2 y sib3 respectivamente (Figura 7). Asimismo, se demostró que el RNAm de P_L es menos estable en condiciones sib⁺ en comparación al mensajero en condiciones sib⁻, disminuyendo concomitantemente la cantidad de integrasa en la infección sib⁺, esto implica que sib ejerce su efecto inhibitorio en un estado post-transcripcional (Guarneros et al., 1982; Schindler y Echols 1981).

Se sabe que la RNAsaIII juega un papel importante dentro del fenómeno de retro-regulación, esto es, los niveles de integrasa son altos tanto en infecciones sib⁺ como en infecciones sib⁻, si la cepa carece de actividad RNAsaIII, estos niveles son comparables a los encontrados en una infección sib⁻ en una cepa de RNAsaIII⁺, esto hace pensar que es la actividad de RNAsaIII la responsable, directa o indirectamente de la inestabilidad del mensajero en condiciones sib⁺ (Belfort 1980; Guarneros et al., 1982).

Figura 7 - Cambios en el DNA producidos por las mutaciones sib1, sib2 y sib3.

Se muestran las secuencias del DNA y RNA transcrito de esta región, con los cambios producidos por las mutaciones sib. Los números debajo de la secuencia del DNA indican la distancia a partir del centro del sitio de integración.

→ + indican una región con simetría invertida. El RNA está dibujado en forma de horquilla para representar la estructura potencial de esta región.

Por estos antecedentes el modelo más aceptado para explicar el mecanismo de inhibición por sib involucra que el RNA_m en la región del terminador t_I puede adoptar una estructura secundaria de tallo y asa, de tal modo que el RNA_m proveniente de P_L al trascender esta señal de terminación puede - - adoptar una estructura secundaria de forma semejante a los sustratos para la RNA_sIII (Figura 8), el mensajero es procesado en esta región y queda -- sensibilizado al ataque de exonucleasas que provocan la rápida inactivación del mensajero del int. En el caso de las mutantes sib se ha considerado que por su localización es muy probable que se desestabilice dicha estructura - secundaria y por lo tanto no son reconocidas por la RNA_sIII, escapando así del fenómeno de retro-regulación (Gottesman 1982; Guarneros et al., 1982).

El papel del sib en el ciclo de vida del bacteriófago lambda aún no es claro y existen ciertas hipótesis sobre el mismo, por ejemplo: Belfort plantea que a bajas multiplicidades de infección (bajos niveles de cII/cIII) la regulación de Int por sib provocaría la reducción de los niveles Int:Xis, - llevando a la desviación de la integración del DNA de lambda en el cromosoma bacteriano, esto es, el desarrollo lítico se vería favorecido. Schindler y Echols del mismo modo sugieren que sib actúa previniendo la síntesis no - deseada de Int durante la respuesta lítica, por lo tanto la predicción es - semejante a la propuesta por Belfort.

Sin embargo Guarneros et al., postulan que el control por sib no es -- importante para el desarrollo lítico del bacteriófago sino para el desarrollo lisogénico, esto es, la síntesis de Int retrasada por sib permitiría la activación coincidente por cII/cIII, de Int y cI, de tal modo que la represión y la integración ocurran concertadamente, la predicción es que en - ausencia de sib la integración ocurriría tempranamente y la replicación del profago provocaría la muerte celular.

Por lo anteriormente expuesto, este trabajo se planteó como objetivo - tratar de responder si el sitio inhibitorio de la región b tiene alguna influencia sobre el desarrollo lítico del bacteriófago lambda.

Figura 8 - Estructuras secundarias del RNA mensajero en la región sib.

- A) La transcripción del gene int a partir del promotor P_I termina en el terminador t_I (región sib) y adopta estructura secundaria de tallo y asa.
- B) La transcripción a partir de P_I no termina en la región sib, por ello la estructura secundaria del mensajero -- cambia y es entonces reconocido como sustrato de la --- RNAsaIII del huésped.

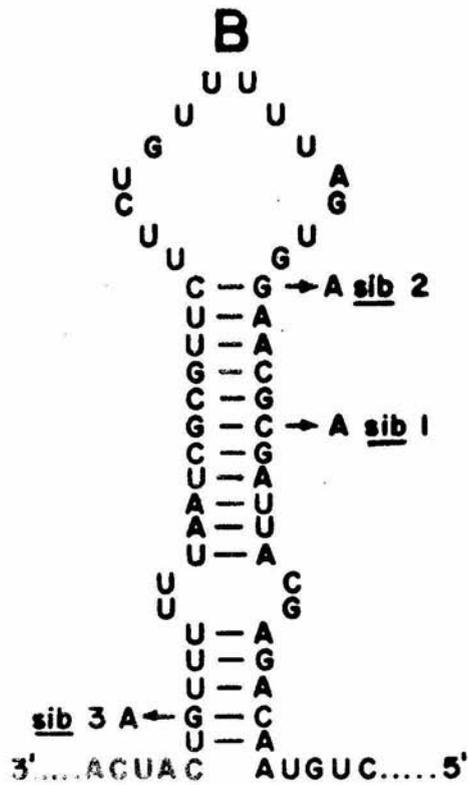
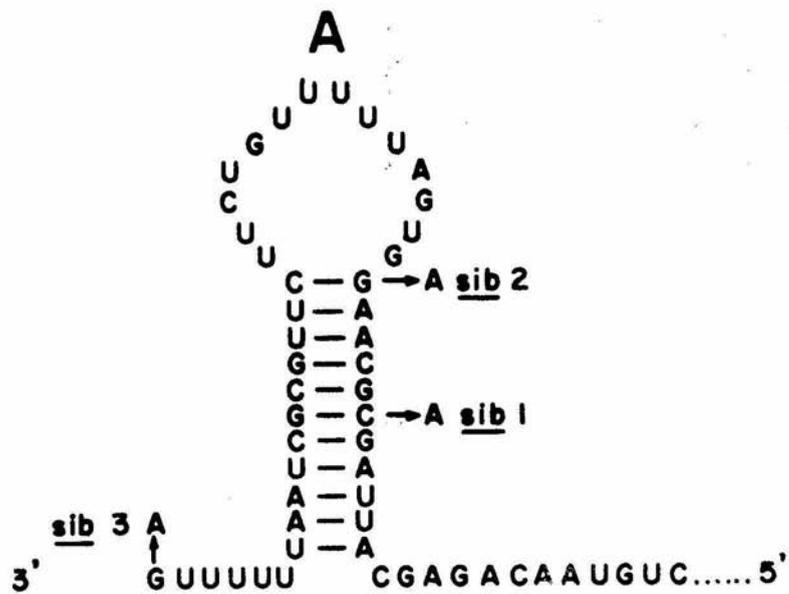


FIGURA 8

M A T E R I A L

Bacterias y Virus.-

Las cepas bacterianas de E. coli K-12 que se utilizaron en el presente trabajo, se encuentran enlistadas en la Tabla 1. Las mutaciones fágicas empleadas en combinaciones diferentes se localizan en la Tabla 2.

Medios de Cultivo.-

Medio LB (triptona 10gr., extracto de levadura 5gr., NaCl 10gr., las cantidades descritas se aforaron a un litro de agua destilada; cuando se preparó como medio sólido se adicionaron 15gr., de agar).

Medio T ϕ (bacto-triptona 10gr., NaCl 2.5gr., 2ml. de NaOH al 2%, agar 10gr., por litro).

Medio T ϕ Suave (triptona 10gr., NaCl 2.5gr., 2ml. de NaOH al 2% y agar 6gr., por litro).

Medio TB (Tryptona 10gr., NaCl 5gr., NaOH al 2% 2.5ml. por litro de agua destilada).

Medio TB-D (Se preparó igual que el TB, y una vez esterilizado se adicionó maltosa a una concentración de 2gr., por litro).

Medio Tet-C (triptona 10gr., NaCl 5gr., agar 1gr., cloruro de 2,3,5 tri-fenil tetrazolium al 1% 2.5ml., se llevó a un litro de agua bidestilada, después de ser esterilizado 20 minutos en autoclave, se añadieron 50ml. de D-galactosa al 20% esterilizada por filtración).

Medio EMB-O (triptona 10gr., extracto de levadura 1gr., NaCl 5gr., azul de metileno 0,065gr., eosina 0.4gr., K₂HPO₄ 2gr., agar 16gr., aforado a un litro de agua bidestilada).

Medio SM (NaCl 5.85gr., gelatina 0,5gr., agua 480ml., el pH fue ajustado a 7.4 y una vez esterilizado se agregaron 45ml. de Tris 1M pH 7 y 2.5ml. de MgSO₄ 1M).

Medio Mínimo RM (NH₄Cl 1gr., KCl 1.5gr., MgSO₄ 7 H₂O 0.5gr., Na₂HPO₄ 12 H₂O 14.4gr., KH₂PO₄ 2.49gr., 0.3ml. de FeCl₃ 0.01M., glicerol 1.6ml., maltosa 4gr., se aforó a un litro de agua bidestilada).

Medio Mac-ConKey (mezcla de Mac-Conkey base DIFCO 40gr., por litro, el azúcar adecuado se adicionó al 1% de concentración final).

Soluciones.-

Solución de Stock de Acrilamida (acrilamida 300gr., bis-acrilamida 8gr., se llevó a un litro con agua bidestilada y se filtró mediante vacío a través de millipore HA 0.45m. Se conservó a 4°C en frasco ámbar).

Buffer Tris pH 8.8 (Tris-base 1M., 12.11gr., se disolvieron en 50ml. de agua destilada, ajustandose el pH con HCl, se aforó a 100ml., y se conservó a 4°C).

Solución SDS al 10% (10gr., de SDS se aforaron a 100ml. de agua bidestilada).

Buffer Tris pH 6.8 (a 6gr. de tris-base se añadieron 20ml. de agua destilada y se ajustó el pH con el HCl, se llevó a 50ml., conservandose a 4°C).

Buffer de Corrida para Electroforesis (glicina 14.4gr., tris-base 3gr., SDS al 10% 10ml., se llevó a un litro con agua bidestilada).

Buffer de Lisis (tris-HCl 0.0625M., SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%).

TABLA 1.

Cepas Bacterianas Empleadas.

<u>Nombre</u>	<u>Características genéticas</u>	<u>Origen</u>
Q ₁	<u>supE</u> , supresor de mutaciones ámbar.	Singer y Weil 1968.
S60i	<u>recA⁻</u> , <u>supO</u> , carece de supresor.	Smith
C-600	<u>thr₁</u> , <u>leu₆</u> , <u>thi₁</u> , <u>supE</u> , - supresor de mutaciones ámbar, <u>lacY₁</u> .	Appleyard, 1954.
S165	<u>supO</u> , carece de supresor.	S. Adhya.
N2668	<u>supO</u> , <u>ligts</u> , impide el crecimiento de fagos con mutación en el gen <u>red</u> .	Colección NIH
M72	<u>supF</u> , supresora de mutaciones ámbar. <u>lacamY_{4,1}</u> , <u>trpCam₈</u> .	Beckwith.
M72(<u>immλ</u>)	<u>supF</u> , supresora de mutaciones ámbar, lisógena para <u>λcI857</u> .	Guarneros y Galindo. 1979.
M72(<u>imm434</u>)	<u>supF</u> , supresora de mutaciones ámbar, lisógena para <u>λimm434</u> .	Guarneros y Galindo. 1979.
M72(<u>imm21</u>)	<u>supF</u> , supresora de mutaciones ámbar, lisógena para <u>λimm21</u> .	Guarneros y Galindo. 1979.
SA731(<u>immλ</u>)	<u>supO</u> , <u>recA⁻</u> , lisógena para el profago (<u>λgal8int2red114cI857cII41</u>).	Guarneros y Galindo. 1979.
SA731(<u>imm434</u>)	<u>supO</u> , <u>recA⁻</u> , lisógena para el profago (<u>λgal8int2red114imm434cII41</u>).	Guarneros y Galindo. 1979.
TM(434)	<u>supO</u> , <u>recA⁻</u> , <u>Gal⁻</u> , lisógena para el profago (<u>λint2red114imm434</u>)	Montañez 1982.
159	<u>supO</u> , <u>recA⁻</u> , <u>strA⁻</u> , <u>uvrA⁻</u> , carece de supresor, sensible a la luz ultravioleta	Patashne 1967.

Continuación Tabla 1.

<u>Nombre</u>	<u>Características genéticas</u>	<u>Origen</u>
N5932	Derivada de la cepa SA500 <u>gal+8lacZx21</u> (<u>ΔBAM c1857</u> <u>ΔHI</u>).	Colección NIH

TABLA 2

Mutaciones fágicas que se emplean.

<u>Nombre</u>	<u>Características Genéticas</u>	<u>Origen</u>
λ <u>cI857</u>	Represor termosensible del fago lambda.	Sussman y Jacob, 1962.
λ <u>b2</u>	Delección del 12% del DNA en la región <u>b</u> . Elimina la región <u>sib</u> .	Kellenberg, 1961.
λ <u>imm434</u>	Híbrido que posee la región de inmunidad del fago lambdaide 434.	Kaiser y Jacob, 1957.
λ <u>imm21</u>	Híbrido que posee la región de inmunidad del fago lambdaide 21.	Liedke y Kaiser, 1967.
λ <u>cII41</u>	Mutación ámbar, suprimible por supE.	Belfort, 1975.
λ <u>red114</u>	Mutación en <u>redB</u> , alterando la recombinación generalizada.	Shulman, 1970.
λ <u>gal8</u>	Sustitución de la región <u>b</u> del fago lambda por el operón <u>gal</u> de <u>E. coli</u> .	Feiss, 1972.
λ <u>bioII</u>	Sustitución del operón <u>bio</u> , eliminando los genes <u>int</u> , <u>xis</u> , <u>red</u> y <u>gam</u> de lambda.	Manly, 1969.
λ <u>HindIII</u> (E.F.)	Delección de los fragmentos E y F producidos por la enzima de restricción HindIII.	Colección NIH.
λ <u>sib1</u>	Mutación puntual, que presenta un cambio de G a T en la posición -158 pb desde att y elimina el mecanismo de retro-regulación.	Guarneros et al., 1982.

M E T O D O S .

Propagación de bacteriófagos por infección en el medio líquido.- Se colocaron en un matraz 10ml. de medio LB, 0.5ml. de la bacteria adecuada, crecida toda la noche en TB-D y 0.1ml. de CaCl_2 1M. A esta mezcla se le adicionó una placa lítica del bacteriófago que se deseaba propagar incubándose a 39°C , por espacio de 3 a 5 horas, hasta obtener lisis. Se añadieron entonces 10 gotas de cloroformo incubando, a temperatura ambiente, durante 15 min. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min., y el sobrenadante obtenido se tituló con diluciones 10^{-6} y 10^{-7} .

Propagación de bacteriófagos por capa confluyente.- Se seleccionó una placa lítica del bacteriófago deseado. Dicha placa fue extraída del agar mediante una pipeta Pasteur y resuspendida en 0.2ml. de un cultivo de la bacteria adecuada; al cual se le añadió MgSO_4 a una concentración final de 0.01M. Se permitió la adsorción del fago por 15 min. a 37°C y posteriormente se adicionaron 3ml. de medio LB (pre incubado a 37°C) y 2ml. de medio T ϕ suave. De esta mezcla se tomaron 2.5ml. para colocarlos en cajas de medio T ϕ y se incubó a 40°C durante aproximadamente 4 hr. Transcurrido este tiempo, se colectó el lisado de cada caja y se adicionaron 3 gotas de cloroformo. Se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min. decantándose el sobrenadante en un tubo estéril. Posteriormente se tituló con diluciones 10^{-6} y 10^{-7} .

Obtención de bacteriófagos recombinantes.- Se creció la cepa adecuada en medio TB-D hasta una D.O._{590nm} = 1 (4×10^8 bacterias por ml.). A este cultivo se le adicionó MgSO_4 a concentración final de 0.01M y la cantidad de fagos por recombinar a la multiplicidad de infección deseada. Se permitió la adsorción de los bacteriófagos durante 3 min. a temperatura ambiente y 17 min. en un baño de hielo-agua, posteriormente se adicionaron 5ml. de TB y se incubó en agitación por 2hr., a 34°C . Finalmente se agregó cloroformo y se plaquearon las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , y 10^{-5} , el huésped adecuado para la selección.

Inactivación de bacteriófagos por tratamiento con agentes quelantes para estimar su contenido de DNA.- La suspensión de fagos se diluyó 100 veces en una solución de citrato de sodio 0.01M pH 8.5 precalentada a 45°C ., la cual se incubó durante 60 min. a 45°C . La reacción fue detenida mediante dilución de las muestras (10 veces) con una solución de Tris-HCl 0.1M. pH, 7.4 y MgSO_4 0.01M y agitando inme--

diatamente (vortex). Los bacteriófagos sobrevivientes se titularon en la cepa bacteriana adecuada. El título inicial fue comparado con el obtenido al terminar la inactivación.

Obtención de cepas lisogénicas.- Las bacterias fueron crecidas en TB-D a 32°C, hasta una concentración de 4×10^8 células por ml. Se tomó una alícuota del cultivo, se adicionó $MgSO_4$ a concentración final de 0.01M y los fagos deseados, a multiplicidad de infección de 10 ufp/célula. Se permitió la adsorción durante 15 min. a temperatura ambiente, adicionándose posteriormente 5ml. de TB. La mezcla se incubó en agitación durante 3hr. a 32°C. Las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} fueron espatuladas en cajas con medio LB. Al día siguiente se probó la inmunidad de cada uno de los candidatos seleccionando en cajas con medio EMB-O de acuerdo con Gottesman y Yarmolinsky (1968).

Determinación del crecimiento de un bacteriófago.- La estimulación del crecimiento de un bacteriófago se realizó por alguna de las siguientes pruebas:

1) Crecimiento en un ciclo.- Se creció la bacteria adecuada en TB-D a 32°C -- hasta una concentración de 4×10^8 células por ml. A 0.1ml. del cultivo se -- añadió $MgSO_4$ a concentración final 0.01M y el fago deseado a la multiplicidad necesaria. Se permitió la adsorción durante 3 min. a temperatura ambiente y - 17 min. en un baño de hielo-agua, pasado este tiempo, se llevó a volumen de - 1ml. con TB-D y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. La pastilla fue resus-- pendida en 1ml. de TB-D diluyendo 1,000 veces en medio de cultivo. Con el fin de determinar centros infectivos, se tomó una alícuota en diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y el resto del cultivo se incubó a 40°C mediante agitación. Se tomaron alícuo-- tas de 0.1ml. para los tiempos 5,10,15,20,30,40 y 50 min., plaqueando en el -- huesped adecuado las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

2) Tasa de eclosión.- Se creció la bacteria adecuada en TB-D a 32°C hasta una concentración de 4×10^8 células por ml. (D.O._{590nm}=1). Se adicionó a 0.1ml. del cultivo $MgSO_4$ a concentración final 0.01M y el fago deseado a la multipli-- cidad necesaria. Se permitió la adsorción durante 3 min. a temperatura ambien-- te y 17 min. en un baño de hielo-agua, se llevó a un volumen constante de 1ml. y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. La pastilla fue resuspendida en 1ml. de TB-D, se procedió a diluir 1,000 veces en medio de cultivo, para evitar re-- infección. La cuantificación de centros infectivos se realizó plaqueando las

diluciones 10^{-1} , 10^{-2} . El resto del cultivo se incubó en agitación a 40°C durante 75 min., titulando con diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

3) Inducción de una cepa lisogénica con represor termosensible.- Se creció - la lisógena en TB-D a 32°C hasta una concentración de 4×10^8 células por ml. (D.O. $590 \text{ nm}=1$), inmediatamente se diluyó hasta 10^{-5} con medio de cultivo y se tomó una alícuota para determinar centros infectivos, estipulando en cajas - con medio LB, las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , el resto del cultivo se incubó en agitación a 43°C por 10 min. y posteriormente se continuó la incubación a 40°C durante 60 min. Al finalizar la incubación se tituló con las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

En los tres casos anteriores, la tasa de eclosión se expresó con el número de bacteriófagos producidos, al finalizar el periodo de incubación, por el número de células infectadas (centros infectivos).

Quantificación de la producción de integrasa por escisión de un profago. Ensayo de superinfección.- Esta técnica descrita por Guarneros y Galindo (1979) -- consiste en cuantificar la eficiencia de escisión de un profago dependiendo de la cantidad de integrasa proporcionada por el bacteriófago superinfectante. -- Esto nos permite saber si el bacteriófago probado presenta o no el mecanismo - de retro-regulación.

La cepa SA731 ($\lambda_{\text{int2}} \text{ red114 } c_{\text{II41}} \text{ gal8}$) o la cepa SA731 ($\lambda_{\text{int2}} \text{ red114 } c_{\text{I857}} c_{\text{II41}} \text{ gal8}$) se creció toda la noche en TB-D a 32°C . Este cultivo fue diluído - en el mismo medio y se continuó la incubación a 32°C hasta una concentración - de 4×10^8 células por ml. Se añadió el bacteriófago a analizar a la multiplicidad de infección adecuada y se permitió que se llevara a cabo la adsorción - incubando durante 3 min. a temperatura ambiente y 17 min. en baño de hielo- -- agua, en presencia de MgSO_4 (0.01M). Las células infectadas fueron diluídas en 5ml. de TB frío y se tomó una alícuota para determinar centros infectivos. Estos se calcularon restando el número de placas resistentes a cloroformo del número total de unidades formadoras de placa. El resto del cultivo fue incubado - - en agitación a 39°C durante 2hr., añadiendo posteriormente cloroformo - - - para completar la lisis celular. Las placas con inmunidad del pro- - --

fago se titularon en la cepa M72 (λ) o M72 (imm434), dependiendo de la inmunidad del bacteriófago superinfectante. La titulación se realizó en medio Tet-C a 34°C con el objeto de distinguir a los bacteriófagos transductores de galactosa (placas rojas) que son producidos por escisión del profago gal⁺, de los bacteriófagos no transductores (placa blanca).

Para calcular el número de profagos escindidos por recombinación sitio-específica, se calculó el número de placas rojas entre el número de centros infectivos. La tasa de eclosión se estimó por la relación entre el número de placas existentes en un huésped heteroinmune al bacteriófago superinfectante y el número de centros infectivos.

Detección de bacteriófagos que carecen del mecanismo de retro-regulación. Tapiz Mixto.- El ensayo del tapiz mixto se llevó a cabo con dos bacterias lisógenas, la cepa SA731 (λ int2 red114 cI857 cII41 gal8) heteroinmune para el bacteriófago probado y la cepa 152 (λ int2 red114 imm434).

Se mezclaron 50 μ l de la bacteria SA731, crecida toda la noche en TB-D, con 70 μ l de la bacteria 152, después de haberse mezclado cuidadosamente las bacterias, se procedió a vaciar esta mezcla con 2.5ml. de agar suave en cajas con medio T ϕ . Posteriormente se picaron placas fágicas sobre este tapiz. Las cajas se incubaron finalmente a 34°C durante 24 horas.

Prueba de complementación cis-trans.- Se creció la bacteria adecuada hasta una concentración de 4×10^8 células/ml. (D.O._{590nm}=1). Se preparó la mezcla de adsorción con 0.1ml. del cultivo, MgSO₄ 0.01M y los bacteriófagos por probar heteroinmunes (ésto es, uno inmunidad lambda y el otro inmunidad 434) con una multiplicidad de 10 para cada uno de ellos. Se permitió la adsorción durante 3 min. a temperatura ambiente y 17 min. en un baño de hielo-agua, tiempo después del cual se aforó a 1ml. y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. La pastilla fue resuspendida en 1ml. de TB-D haciendo una dilución 10^{-3} de donde se partió para calcular centros infectivos empleando las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en los huéspedes M72 (imm λ) y M72 (imm434). El resto del cultivo se incubó en agitación a 40°C durante 75 min. Al término de este tiempo, se plaquearon las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en los mismos huéspedes usados para determinar centros infectivos.

Se calculó la tasa de eclosión de cada uno de los bacteriófagos en los huespedes indicados.

Obtención de suspensiones de bacteriófagos con alto título.- La cepa C-600 se creció toda la noche en 50ml. de LB. Al día siguiente 900ml. de medio LB fue inoculado con el cultivo toda la noche y se le añadió 10^8 ufp del bacteriófago de seado suplementado con CaCl_2 a una concentración final de 10mM. Se procedió a incubar en agitación a 39°C hasta lisis (aproximadamente 5 horas) tiempo después del cual se añadió cloroformo, con el fin de completar la lisis celular, incubando durante 15 min. a temperatura ambiente. Los restos celulares se desecharon por centrifugación durante 10 min. a 10,000 rpm. Al sobrenadante se le adicionó PEG (10gr. por cada 100ml.) y NaCl (concentración final 0.5M) y se procedió a agitar durante 1 hr. a 4°C , para disolver el PEG y precipitar el bacteriófago; pasado este tiempo se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 min., resuspendiendo la pastilla en 2ml. de SM y dos volúmenes de cloroformo, esta mezcla fue centrifugada a 5,000 rpm por 10 min., el sobrenadante conteniendo la suspensión de fagos debe quedar exento de PEG y cloroformo para ser colocado entonces en una solución de CsCl (4.5gr. de CsCl por 5.5ml. de sobrenadante) la cual fue centrifugada a 40,000 rpm durante un mínimo de 24 hr. Se extrajo la banda opalescente de bacteriófagos y se dializó contra una solución de Tris-Mg (0.01M) y NaCl (5M) durante 2 hr.; posteriormente contra Tris-Mg (0.01M) y NaCl (0.25M) durante 2 hr. y finalmente contra Tris-Mg (0.01M) desprovista de NaCl durante 2 hr. La suspensión dializada se colecta en condiciones de esterilidad titulándose con diluciones 10^{-8} , y 10^{-9} en el huesped adecuado.

Irradiación con luz ultravioleta.- La irradiación con luz ultravioleta se utilizó para:

a) Determinar la sensibilidad de las diferentes cepas a la luz ultravioleta. Las diferencias en sensibilidad se deben a la existencia de alteraciones en el mecanismo de reparación de la bacteria, lo que ocasiona que no se pueda corregir los daños causados por la irradiación.

Para identificar las cepas que carezcan de alguno de dichos mecanismos, se elaboran determinaciones de sobrevivencia a diferentes tiempos de irradiación.

Se creció la cepa adecuada hasta una concentración de 4×10^8 células/ml. en medio LB. 3ml. del cultivo se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min. y la pasti-

lla fue resuspendida en el mismo volumen del medio RM. El cultivo se colocó en una caja de Petri y se procedió a irradiar con una lámpara germicida (GE G8T5) a 50 cm. de distancia. A los diferentes tiempos de irradiación: 5seg., 10seg., 20seg., 25seg., y 30seg. se tomaron alícuotas de 0.1ml. que fueron espatuladas en las diluciones adecuadas en cajas con medio LB, incubando toda la noche a -34°C.

b) Obtención de células irradiadas para experimentos de incorporación de aminoácidos radioactivos.- La cepa 159, sensible a la luz ultravioleta, fue crecida en 20ml. de medio RM adicionando con $MgSO_4$ a una concentración final de 1mM y $CaCl_2$ (0.1mM). Cuando el cultivo llegó a una concentración de 2×10^8 células por ml. (D.O._{590nm}=0.5) fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 min. La pastilla fue resuspendida en 4ml. de medio RM, conteniendo $MgSO_4$ (1mM) y $CaCl$ (0.1-mM) y la suspensión fue colocada en una caja Petri, procediendo a irradiar en agitación, con una lámpara germicida GE G8T5 a 10cm. de distancia. Se tomaron alícuotas de 0.2ml. a los diferentes tiempos de irradiación (0, 0.5, 1 y 1.5 - minutos). Estas células fueron utilizadas inmediatamente en los experimentos - de incorporación de aminoácidos radioactivos.

Incorporación de precursores radioactivos a proteínas sintetizadas por el bacteriófago lambda en células irradiadas.- Una concentración de 2×10^8 células/ml. de la cepa 159 (recien irradiada) fue infectada con el bacteriófago deseado a una multiplicidad de 10 y aumentando la concentración de $MgSO_4$ hasta 10mM. Se permitió la adsorción en un baño de hielo-agua durante 20 min. Después de este tiempo las células se traspasaron a 1ml. de medio RM adicionado con el $MgCl_2$ -- (15mM) y $CaCl$ (0.1mM), en este momento se adicionó metionina - S^{35} (0.075 mCi por ml.) y mezcla de aminoácidos - C^{14} (10 mCi por ml.). La suspensión se incubó, con agitación a 40°C durante 10 min., deteniendo la reacción mediante NaN_3 a una - concentración final de 50mM y enfriamiento rápido mediante un baño de hielo-agua durante unos minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 10 min. La pastilla fue resuspendida en 1ml. de buffer de lisis. Las muestras se congelaron a -20°C para su análisis posterior. Para cuantificar (medida por la -- incorporación del precursor radioactivo) se tomaron alícuotas de 0.01ml. las - cuales se colocaron sobre discos de papel Whatman 3mm. que una vez secos se -- colocaron en una solución fría de TCA al 10% durante 15 min., lavándose poste- riormente en TCA al 5% y posteriormente en etanol, se transfieren a una solución de etanol-éter, en proporciones iguales y pasados 5min., se transfieren a éter -

puro por espacio de 5 min. Se permite que se sequen completamente y se colocan en viales con 5ml. de líquido de centelleo y se determina la cantidad de radioactividad incorporada mediante un contador de centelleo líquido.

Análisis de las proteínas sintetizadas por el bacteriófago lambda en células -- irradiadas. - Las proteínas sintetizadas en células infectadas fueron analizadas en geles de acrilamida-dodecilsulfato de sodio al 10% (Laemli 1970), los cuales se prepararon de acuerdo al siguiente protocolo:

En un matraz de 10ml. se mezclaron 10ml. de la solución stock de acrilamida al 30%; 11.25ml. de Tris-HCl pH 8.8; 0.3ml. de SDS al 10%; 8.25ml. de agua bidestilada; 0.12ml. de persulfato de amonio y 0.025ml. de TEMED. Una vez que se permitió una buena mezcla de las soluciones (2min. aproximadamente) se procedió a vaciar la misma en placas para gel permitiendo la polimerización a temperatura ambiente durante 30 min. aproximadamente, con el fin de permitir una superficie homogénea se colocó SDS al 0.1% en la parte superior del gel. Una vez que el gel polimerizó se retiró el SDS y se procedió a colocar el gel concentrador al 4%, el cual se preparó de la siguiente manera: 1.33ml. de solución stock de acrilamida al 30%; 1.25ml. de solución de Tris-HCl pH 6.8; 0.1ml. de SDS al 10%; 7.2ml. de agua bidestilada; 0.1ml. de persulfato de amonio al 10% y 0.005ml. de TEMED. Con esta mezcla se llenaron completamente las placas y se colocó el peine deseado. Se permitió la polimerización por espacio de 30min. aproximadamente.

El gel se pre-corrió a 100V durante 30 a 60min. El buffer de corrida empleado se describe en la sección de soluciones. Pasado este tiempo las muestras fueron descongeladas y se colocaron en un baño de agua a 90°C por espacio de 3min., finalmente fueron colocadas en el gel, el cual fue corrido a 100V durante 5hr. -- ó hasta que el colorante salió del gel.

Posterior a la corrida, se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie -- R-250 durante 45min. aproximadamente y destiñiendo toda la noche en una solución de metanol-ácido acético.

En caso de que el gel fuera sometido a fluorografía, se procedió a deshidratar con dos volúmenes de DMSO durante 45min., posteriormente se transfirió a una solución de PPO al 22.5% en el DMSO por espacio de 3hr. y finalmente en una solución de glicerol al 1% en agua, donde se mantuvo por un tiempo mínimo de 1hr. - -

Después de este tiempo los geles se secaron y se expusieron en contacto con una placa de rayos X-Mat Kodak manteniendolo así a -90°C por un período de 5 a 7 días. La placa fue revelada y el patrón de proteínas obtenido fue analizado por absorbancia a 600nm. en un espectofotómetro Beckman Modelo DU-8.

RESULTADOS

I. Construcción de bacteriófagos.

- a) Obtención de los bacteriófagos λ_{red114} c_{I857} c_{II41} y λ_{sib1} $red114$ c_{I857} c_{II41} .

Estos bacteriófagos se obtuvieron por recombinación entre los bacteriófagos λ_{gal8} $red114$ c_{I857} c_{II41} , λ_{bio11} $imm434$ y λ_{sib1} $bio11$ $imm434$ -- (Figura 9).

La recombinación se llevó a cabo en la cepa bacteriana S601 a 34°C., con una multiplicidad de infección de 10 para cada uno de los progenitores; la selección de los candidatos recombinantes se realizó en la cepa bacteriana M72 en medio indicador Tet-C a 34°C. Los progenitores λ_{sib1} $bio11$ $imm434$ y λ_{bio11} $imm434$, no crecen en esta cepa porque su desarrollo se encuentra restringido al carecer de los genes red y gam en la cepa huésped M72 ($recA^-$) (Zissler et al., 1971); por otro lado el progenitor λ_{gal8} $red114$ c_{I857} c_{II41} , por ser un bacteriófago transductor de -- galactosa da placas rojas en medio Tet-C, en el huésped M72 ($lac\Delta$).

Los bacteriófagos recombinantes producen placas blancas y de aspecto turbio, los candidatos seleccionados fueron purificados y propagados en la cepa C-600, de la manera que se describe en Material y Métodos.

Los marcadores genéticos de los bacteriófagos recombinantes se probaron de la siguiente manera:

Figura 9 - Obtención de los bacteriófagos λ red114 cI857 cII41 y λ sib1 red114 cI857 cII41.

La forma de obtención y selección se describe en el texto.

La línea continua representa a los fagos progenitores y la línea discontinua indica la recombinante seleccionada.

Los marcadores genéticos se representan de la siguiente manera:

Recuadro sólido (gal8 y bio11) son substituciones del DNA del fago por regiones del cromosoma bacteriano.

Recuadro sombreado (imm434) substitución del DNA de lambda por DNA del fago lambdaoide 434.

Los marcadores relevantes del bacteriófago están indicados.

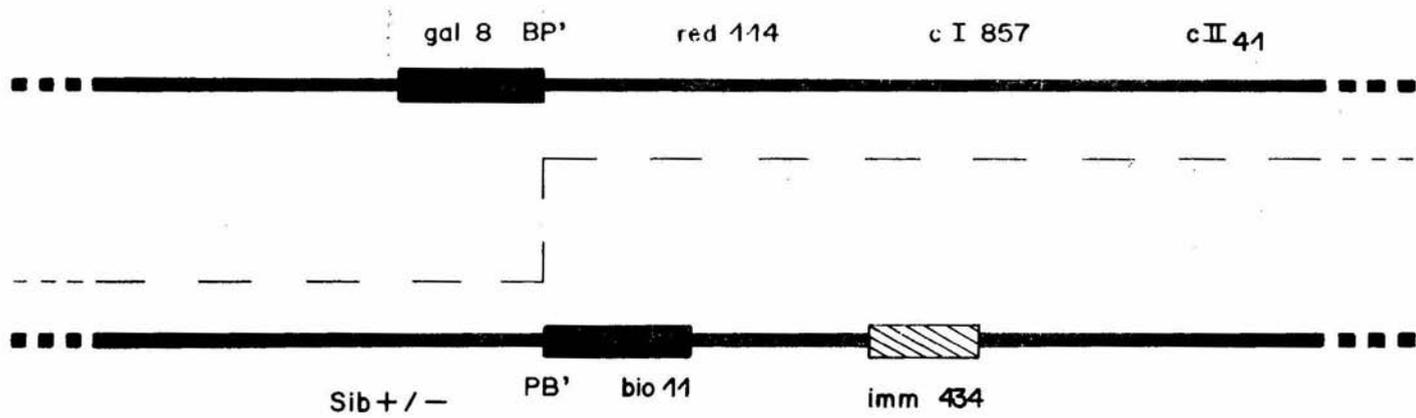


Fig. 9

- 1) Ausencia de crecimiento en la cepa N2668. Esta cepa inhibe el crecimiento de los bacteriófagos red⁻;
- 2) Formación de placas claras en la cepa S165 (sup0), a causa de la mutación en el gen cII;
- 3) Crecimiento turbio a 34°C y claro a 40°C en la cepa M72 (supF), debido a la mutación termosensible en el represor;
- 4) Finalmente se verificó el marcador sib, al cuantificar la eficiencia de escisión de un profago flanqueado por los sitios PP' y BB', específicos de la recombinación integrativa, promovida exclusivamente por la acción de la integrasa (Guarneros y Galindo, 1979) o por la prueba del Tapiz Mixto (Montañez, 1982).

b) Obtención de los bacteriófagos λred114 cI857 y λsib1 red114 cI857.

La obtención de estos bacteriófagos se realizó por medio de una cruce entre los progenitores λred114 imm434 cII41, λsib1 red114 imm434 cII41 y λgal8 red114 cI857 (Figura 10).

La recombinación se llevó a cabo en la cepa bacteriana S601, a 34°C., con una multiplicidad de infección de 10 para cada uno de los progenitores, la selección de los bacteriófagos recombinantes se efectuó en la cepa bacteriana S165 en medio Tet-C a 34°C.

Los progenitores λred114 imm434 cII41 y λsib1 red114 imm434 cII41 provocan la aparición de placas de aspecto claro y el progenitor λgal8 red114 cI857 provoca la aparición de placas rojas; los candidatos recombinantes promueven la aparición de placas turbias, ya que rescatan el gen cII funcional, estos candidatos fueron purificados y propagados en la cepa C-600.

Los marcadores genéticos fueron probados para los candidatos recombinantes, de la manera anteriormente descrita, excepto que el crecimiento en la cepa S165 debe provocar la aparición de placas turbias a 32°C y -- claras a 42°C.

Figura 10 - Obtención de los bacteriófagos λ red114 c1857 y λ sibl red114 c1857.

La forma de obtención y selección se describe en el texto.

La línea continua representa a los fagos progenitores y la línea discontinua indica la recombinante seleccionada.

Los marcadores genéticos se representan de la siguiente manera:

Recuadro sólido (gal8) es una substitución del DNA del fago por regiones del cromosoma bacteriano.

Recuadro sombreado (imm434) substitución del DNA de lambda por el DNA del fago lambdaide 434.

Los marcadores relevantes del bacteriófago están indicados.

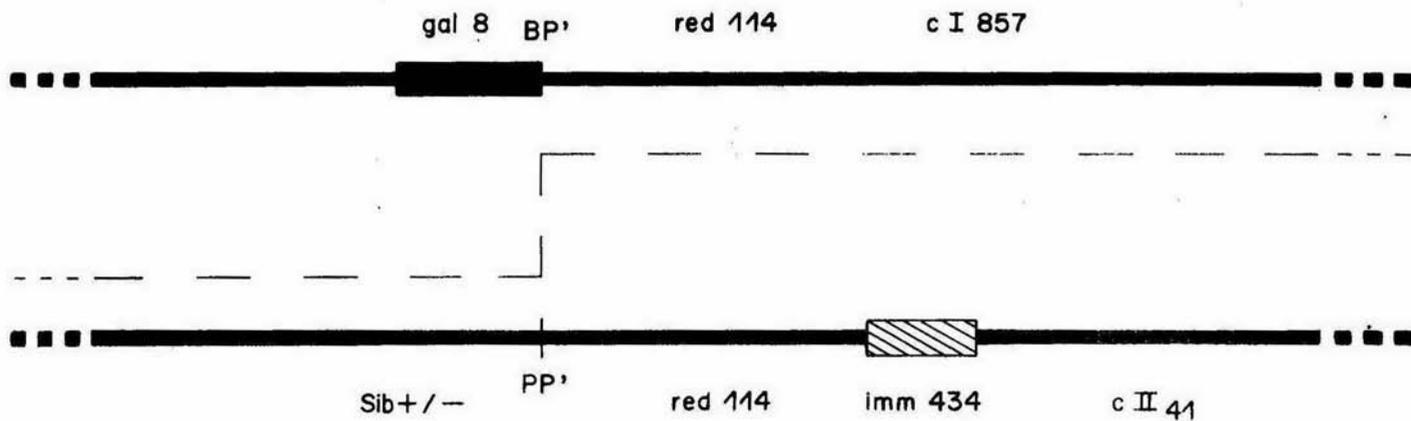


Fig. 10

c) Obtención de los bacteriófagos λ HindIII Δ red114 cI857 y λ HindIII Δ sib1 red114 cI857.

Estos bacteriófagos recombinantes se obtuvieron a partir de los progenitores λ HindIII Δ red114 imm434 cII41, λ HindIII Δ sib1 red114 imm434 cII41 y λ gal8 red114 cI857 (Figura 11).

La recombinación se llevó a cabo en la cepa bacteriana S601 a 34°C. y a una multiplicidad de infección de 10 para cada uno de los progenitores; la selección de los candidatos recombinantes se efectuó en la cepa S165, en medio Tet-C a 34°C.

Los progenitores λ HindIII Δ red114 imm434 cII41 y λ HindIII Δ sib1 - - red114 imm434 cII41, provocan la aparición de placas claras y el progenitor λ gal8 red114 cI857 promueve la aparición de placas rojas; los candidatos recombinantes aparecen fenotípicamente como turbios, los candidatos se purificaron y propagaron.

Los marcadores genéticos de los bacteriófagos recombinantes fueron probados como se describió anteriormente, con la salvedad de que la mutación HindIII se verificó comparando con el bacteriófago silvestre su resistencia a los agentes quelantes tal como citrato de sodio, EDTA, etc. Este tratamiento inactiva al bacteriófago lambda de forma directamente proporcional al contenido de DNA del fago (Parkinson y Huskey, 1971).

Figura 11 - Obtención de los bacteriófagos λ HindIII Δ red114-c1857 y λ HindIII Δ sibl red114 c1857.

La forma de obtención y selección se describe en el texto.

La línea continua representa a los fagos progenitores y la línea discontinua indica la recombinante seleccionada.

Recuadro sólido (gal8) es una substitución del DNA del fago por regiones del cromosoma bacteriano.

Recuadro sombreado (imm434) substitución del DNA de lambda por el DNA del bacteriófago lambdaoide 434.

Recuadro abierto (HindIII) deleción de aproximadamente el 8% del DNA del fago.

Los marcadores relevantes del bacteriófago están indicados.

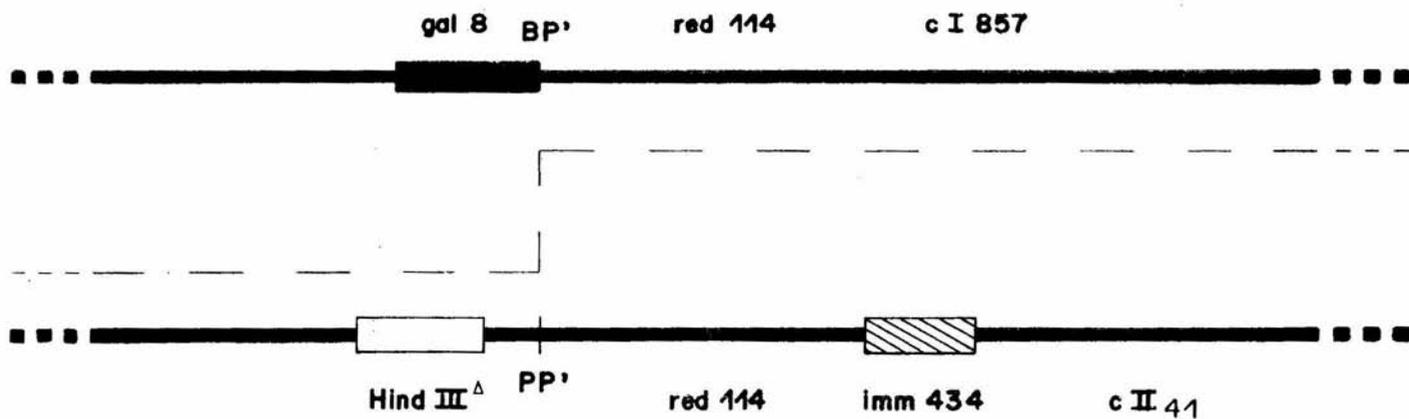


Fig. 11

II. Estudio del desarrollo lítico del bacteriófago lambda en condiciones de infección sib^+/sibl .

Como el objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el efecto de sib en el desarrollo lítico de lambda, se eligió la tasa de eclosión como una expresión de dicho desarrollo. En dicho ensayo podemos detectar el número de partículas fágicas producidas por cada célula infectada.

a) Ensayos de tasa de eclosión.

La cepa bacteriana Q1 fue sometida a infección con los bacteriófagos $\lambda_{\text{red114 imm434ts cII41}}$, $\lambda_{\text{sibl red114 imm434ts cII41}}$ y $\lambda_{\text{b2\Delta red114 imm434ts cII41}}$ a una multiplicidad de infección de 10 en cada caso, -- posteriormente la suspensión se incubó en agitación a 40°C., con el objeto de inactivar el represor y que la población de bacteriófagos siguiera el camino lítico.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 3, en donde podemos observar que existe una diferencia en la tasa de eclosión de aproximadamente tres veces a favor de las infecciones $\lambda_{\text{b2\Delta}}$ y λ_{sibl} en comparación a la infección λ_{sib^+} . Esta diferencia aunque no fue de gran magnitud, fue reproducible en todos los ensayos llevados a cabo con estos bacteriófagos.

Con el objeto de observar si esta diferencia resultaba extensiva a otras condiciones de inmunidad, se realizó el ensayo de tasa de eclosión con bacteriófagos de inmunidad lambda (cI857) en las mismas condiciones de infección e incubación mencionadas anteriormente.

Los resultados enlistados en la Tabla 4 mostraron que nuevamente la infección con el bacteriófago λ_{sibl} produce tres veces más progenie que la infección λ_{sib^+} . Esto demuestra que la diferencia en la tasa de eclosión es independiente de la especificidad del represor del fago.

TABLA 3

EFEECTO DE sib EN LA INFECCION LITICA POR
 EL BACTERIOFAGO λ red114 imm434ts cII41,
 λ sibl red114 imm434ts cII41 Y λ b2 Δ red114
imm434ts cII41

Bacteriófago	Tasa de eclosión	
λ <u>red114 imm434ts cII41</u>	4.3	5
λ <u>sibl red114 imm434ts cII41</u>	12.5	15
λ <u>b2Δ red114 imm434ts cII41</u>	15	18

La cepa bacteriana Q1 fue infectada a mdi de 10, con los bacteriófagos enlistados; después de permitir la adsorción se incubó a 40°C. durante 75 min. La tasa de -- eclosión representa el número de ufp/ci. Las dos columnas de valores muestran resultados de ensayos independientes.

TABLA 4

EFFECTO DE sib EN LA INFECCION LITICA POR
 EL BACTERIOFAGO $\lambda_{\text{red114 cI857 cII41}}$ Y
 $\lambda_{\text{sib1 red114 cI857 cII41}}$

Bacteriófago	Tasa de eclosión	
$\lambda_{\text{red114 cI857 cII41}}$	5	7
$\lambda_{\text{sib1 red114 cI857 cII41}}$	15	16.4

b) Inducción de lisógenas.

Para definir si la tasa de variación está asociada al proceso de infección o se presenta también en la inducción del profago, se realizó un ensayo de inducción de una cepa lisógena con represor termosensible y se determinó la producción de partículas fágicas por cada lisógena.

Para este ensayo se utilizaron bacteriófagos de inmunidad lambda, los cuales difieren de los anteriormente utilizados por la presencia del gen cII funcional, lo cual favorece el aislamiento de lisógenas.

Las cepas lisógenas se obtuvieron por infección de la cepa bacteriana Q1 y posterior incubación a 32°C., durante 2 hrs., las colonias aisladas fueron probadas de tal manera que se obtuvieron lisógenas sencillas y estables de acuerdo con Gottesman y Yarmolinsky (1968). Con las cepas aisladas se realizó el ensayo de inducción, en el cual, un número determinado de células fueron sometidas a un pulso térmico de 43°C., durante 60 min., determinando el número de partículas producidas.

Cabe aclarar, que estos mismos bacteriófagos (λred114 cI857 y -- λsib1 red114 cI857) fueron utilizados en los ensayos de tasa de eclosión tal y como se ha descrito, excepto, que la multiplicidad de infección fue de 0.1.

Los resultados de ambos ensayos se detallan en la Tabla 5, en -- donde nuevamente podemos observar, que el bacteriófago λsib1 produce tres veces más progenie que el fago λsib⁺; estos resultados son comparables a los presentados con los bacteriófagos cII⁻, ya que en este caso se consiguió el efecto fenotípico cII⁻ utilizando una sola copia del genoma por célula.

TABLA 3

EFFECTO DE sib EN LA INFECCION LITICA E INDUCCION
 DEL PROFAGO POR EL BACTERIOFAGO λred114 cI857 Y
λsibl red114 cI857

Bacteriófago	Tasa de eclosión	
	Inducción	Infección
<u>λred114 cI857</u>	6	7
<u>λsibl red114 cI857</u>	15	15

c) Crecimiento en un ciclo.

Una probable explicación para la diferencia en la tasa de eclosión entre los bacteriófagos λ_{sib}^+ y λ_{sibl} era que existiese un desfase en los tiempos de maduración y liberación de progenie, de modo que al tiempo de registrar las partículas fágicas producidas, este número fuera mayor en la infección λ_{sibl} y que la infección λ_{sib}^+ -- alcanzara este valor en un tiempo diferente. Con el fin de descartar esta posibilidad se llevó a cabo la determinación de las partículas fágicas producidas en función del tiempo de infección por medio del crecimiento en un ciclo, en condiciones de infección $sib^+/sibl$.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 12, donde podemos observar que la producción diferencial de progenie no es debida a un desfase en el tiempo de maduración entre ambas infecciones, ya que en los dos casos se alcanza un máximo de ufp a los 40 min. y se mantiene constante a los 50 min.

III. Estudio del desarrollo lítico del bacteriófago lambda en condiciones de infección $\lambda_{HindIII\Delta} sib^+/\lambda_{HindIII\Delta} sibl$.

Con la evidencia obtenida hasta aquí y con la premisa de que un bacteriófago $\lambda_{b2\Delta}$ produce una eclosión mayor que el bacteriófago silvestre (ver Tabla 3), se consideró la posibilidad de que en la región b existiese algún inhibidor para la producción de progenie sobre el cual sib tuviese alguna influencia.

A partir de la consideración anterior se realizaron ensayos con los bacteriófagos $\lambda_{HindIII\Delta}$, los cuales poseen una delección de aproximadamente el 8% del DNA sobre la región b a partir de los -250 pb del sitio de integración, esto es, conservan el sitio retro-regulador (Figura 13).

Figura 12 - Crecimiento en un ciclo.

La cepa bacteriana Q1 fue sometida a infección con los bacteriófagos λ_{red114} c_{I857} c_{II41} y λ_{sib1} $red114$ c_{I857} c_{II41} a una multiplicidad de infección de 10 para cada caso; después de permitir la adsorción, se incubó a -- 40°C. y se determinó el número de ufp a los tiempos de infección indicados.

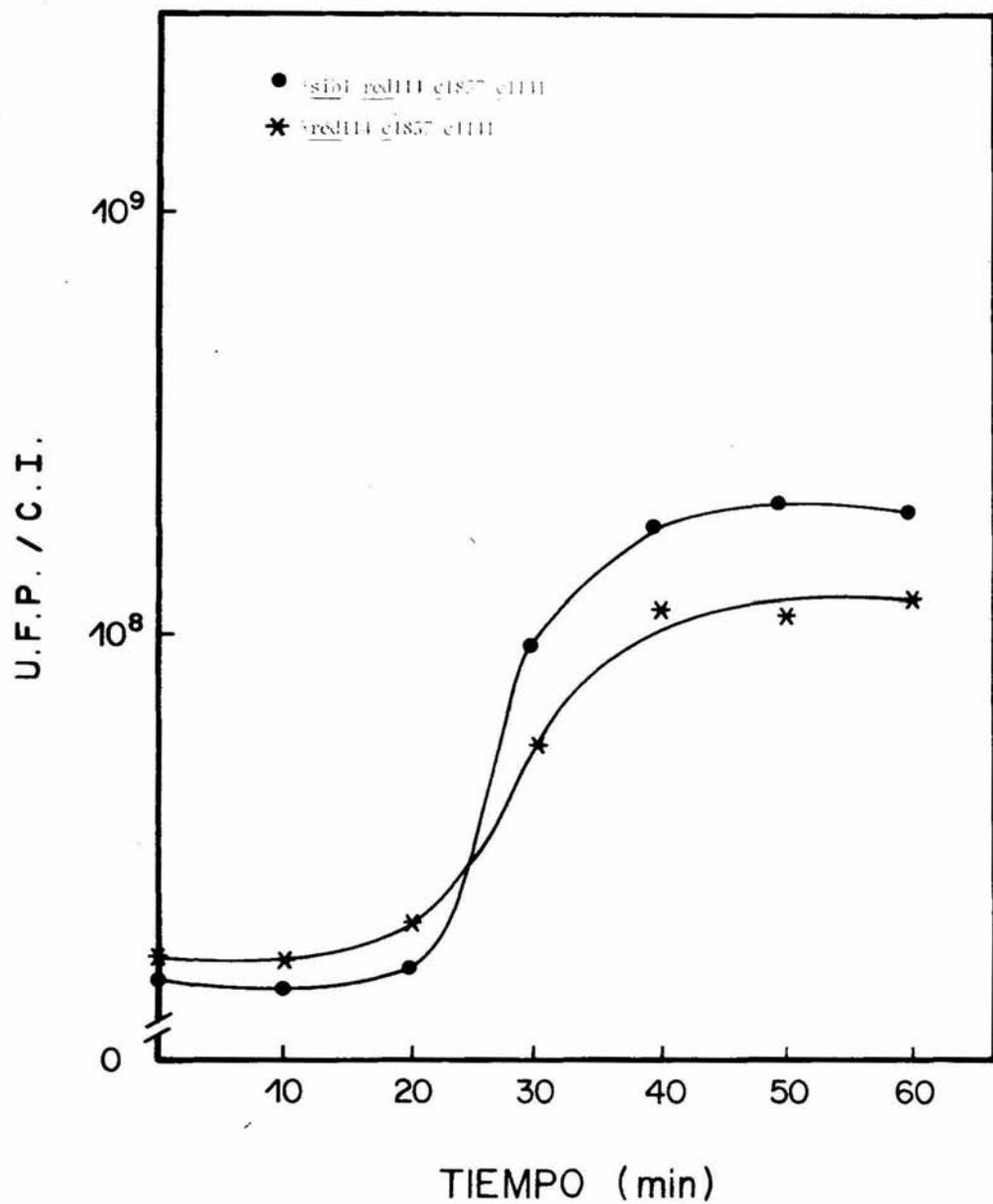


Fig. 12

Figura 13 ³ Extensión de la deleción HindIII.

En la figura se esquematiza con franja punteada el DNA de lambda comprendido desde la región b al gene int.

Las franjas abiertas representan las deleciones b2 y HindIII. La primera principia en el sitio de integración (PP'), eliminando el 12% del DNA sobre la región b. La segunda principia después del sitio retro-regulador; esto es, a -250pb a partir de PP' eliminando el 8% del DNA sobre la región b.

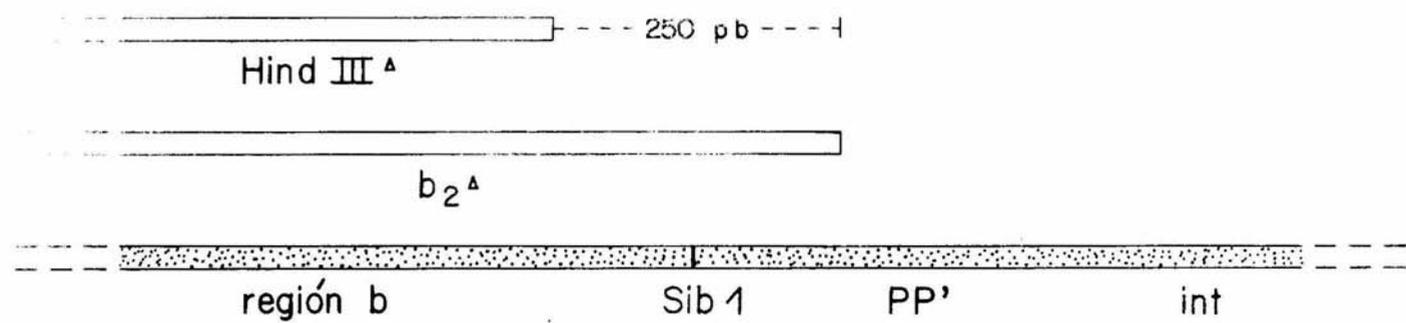


Fig. 13

Se realizó el ensayo de tasa de eclosión con los bacteriófagos λ HindIII Δ sib⁺ y λ HindIII Δ sib1, como podemos observar en la Tabla 6 la eclosión de ambos fagos es igual, siendo estos valores semejantes a los de la eclosión de un fago λ b2 Δ , o bien, λ b2⁺ sib1. Esta evidencia apoya la hipótesis de que en la región b existe un inhibidor de la producción de progenie y que a su vez es afectado por sib.

IV. Prueba de Complementación.

Con el objeto de saber si este inhibidor afecta en cis o en trans la producción de progenie, se llevó a cabo una prueba de complementación, en la cual los bacteriófagos que carecen de inhibidor (λ HindIII Δ) son complementados con los bacteriófagos λ sib⁺ y λ sib1, de manera que si el inhibidor es un producto difusible, la tasa de eclosión de los bacteriófagos que carecen del inhibidor se verá afectada al complementar con el bacteriófago que si lo posee.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la complementación y podemos darnos cuenta que la tasa de eclosión de los bacteriófagos λ HindIII Δ se afectó de tal manera que presentan el patrón diferencial de los bacteriófagos λ sib1 > λ sib⁺, indicándonos que el inhibidor actúa en trans y por lo tanto es un producto difusible, probablemente una proteína codificada en la región b.

V. Análisis electroforético de las proteínas del bacteriófago lambda.

En base a la evidencia obtenida hasta aquí, se pensó que probablemente este inhibidor era una proteína de la región b regulada por sib y una posibilidad era que la regulación fuese a nivel de síntesis de la misma.

TABLA 6

EFFECTO DE sib EN LA INFECCION LITICA POR
 EL BACTERIOFAGO λ HindIII Δ red114 cI857 Y
 λ HindIII Δ sib1 red114 cI857

Bacteriófago	Tasa de eclosión	
λ <u>HindIII</u> Δ <u>red114</u> <u>cI857</u>	9.15	12
λ <u>HindIII</u> Δ <u>sib1</u> <u>red114</u> <u>cI857</u>	9.5	12.3

TABLA 7

PRUEBA DE COMPLEMENTACION

Bacteriófago	Tasa de eclosión
λ <u>HindIII</u> Δ <u>red114</u> <u>imm434ts</u> <u>cII41</u>	20
λ <u>sib1</u> <u>red114</u> <u>cI857</u>	15.6
λ <u>HindIII</u> Δ <u>sib1</u> <u>red114</u> <u>imm434ts</u> <u>cII41</u>	2.8
λ <u>red114</u> <u>cI857</u> <u>cII41</u>	3.7

La cepa bacteriana M72 fue coinfectada con las parejas de bacteriófagos enlistados (mdí de 10) después de permitir la adsorción se incubó a 40°C. durante 75 min. La determinación de ufp y ci se realizó en las cepas M72 --- (imm434) y M72 (imm λ).

Para abordar este punto, se analizó el patrón electroforético de las proteínas de la región b, sintetizadas en condiciones de infección λ sib⁺ y λ sib1, con el sistema de células irradiadas.

Esta metodología (Ptashne 1967), consiste en utilizar una cepa bacteriana incapaz de reparar los daños del DNA causados por la radiación ultravioleta, por lo tanto después de un tiempo de exposición a dicho agente, se produce una disminución en la sobrevivencia. En la Figura 14 observamos como la cepa 159 (uvrA⁻), deficiente en un sistema de reparación del DNA, presenta una sobrevivencia muy baja; la cepa silvestre posee una alta fracción de sobrevivientes como consecuencia de un sistema de reparación normal; finalmente la cepa S601 (recA⁻) es intermedia en la fracción de sobrevivientes, debido a una mutación en el sistema de reparación SOS (Witkin, 1976; Little y Mount, 1982).

Cuando la cepa 159 (uvrA⁻) se sometió a irradiación con luz ultravioleta y posterior incubación en presencia de aminoácidos radioactivos se observó, mediante el patrón electroforético, que la síntesis de proteínas fue abatida conforme aumentó el tiempo de irradiación (Figura 15, panel A); sin embargo, cuando las células irradiadas son infectadas, se observó que las proteínas del bacteriófago infectante son sintetizadas y por lo tanto pueden ser analizadas electroforéticamente, ya que queda eliminado el fondo de las proteínas celulares (Figura 15, panel B).

a) Identificación de las proteínas codificadas en la región b.

Para la detección de las proteínas codificadas en la región b, se utilizó la cepa 159 y los bacteriófagos λ red114 imm434ts cII41 y λ b2Δ red114 imm434ts cII41. El patrón electroforético de los extractos celulares se muestra en la Figura 16. Como puede observarse fue evidente -

Figura 14 - Curva de sobrevivencia a la luz ultravioleta.

Las cepas S165 (silvestre), S601 (RecA⁻) y 159 (uvrA⁻) fueron irradiadas con luz ultravioleta. Se determinó la cuenta viable a diferentes tiempos de irradiación y se calculó la fracción de sobrevivientes para cada cepa bacteriana.

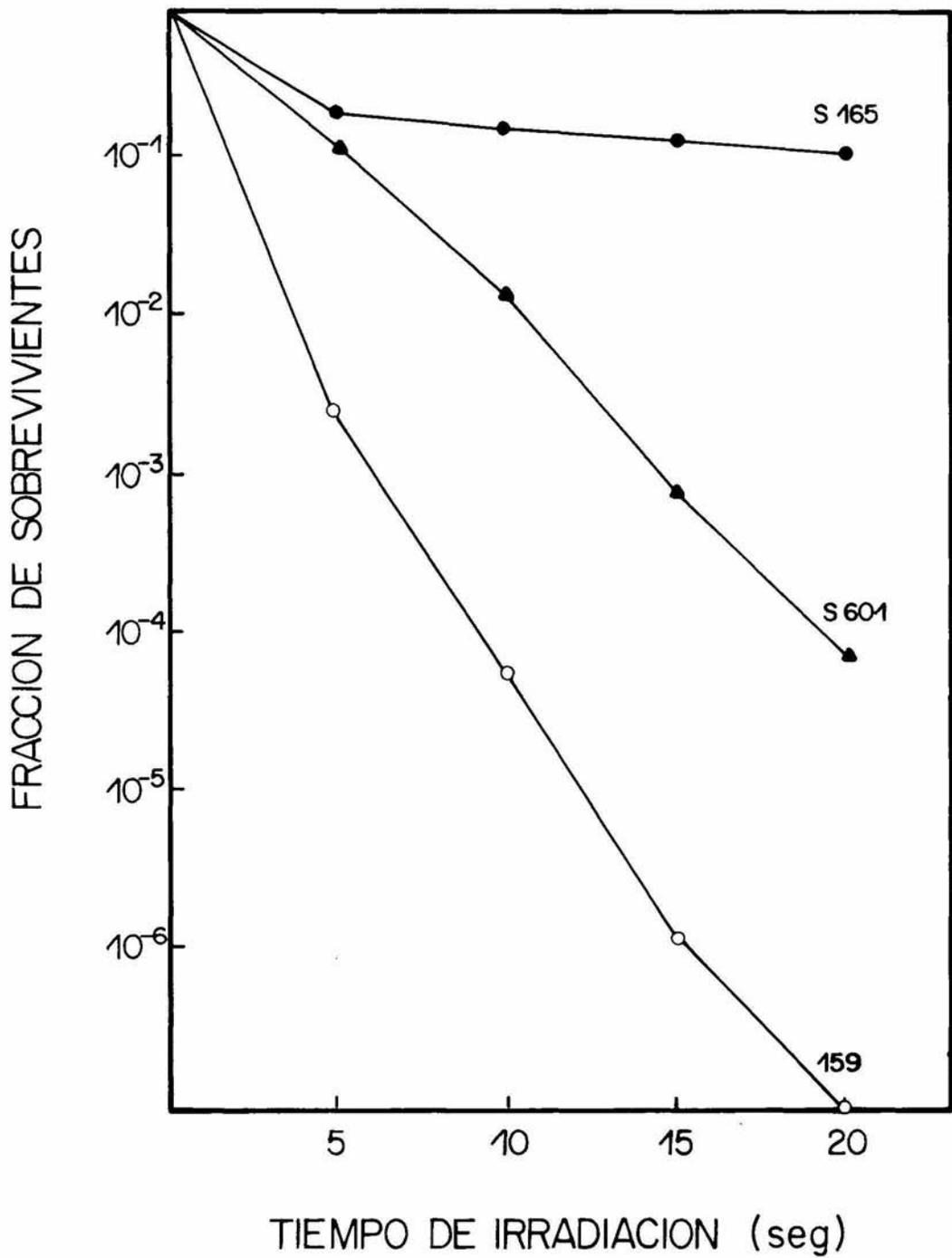


Fig. 14

Figura 15 - Síntesis de proteínas en la cepa 159.

En el panel A se observa el autorradiograma de un gel de acrilamida - SDS de extractos celulares de la cepa 159 irradiada durante 0, 0.5 y 1 minuto y posteriormente incubada en presencia de 10 μ C de mezcla de aminoácidos- C^{14} durante 10 minutos.

En el panel B se muestra el autorradiograma de un gel de acrilamida - SDS de extractos celulares de la cepa 159 irradiada a los tiempos mencionados e infectada con el bacteriófago λ sib1 red114 imm434ts cII41 y posteriormente incubada en presencia de 10 μ C de mezcla de aminoácidos- C^{14} durante 10 minutos.

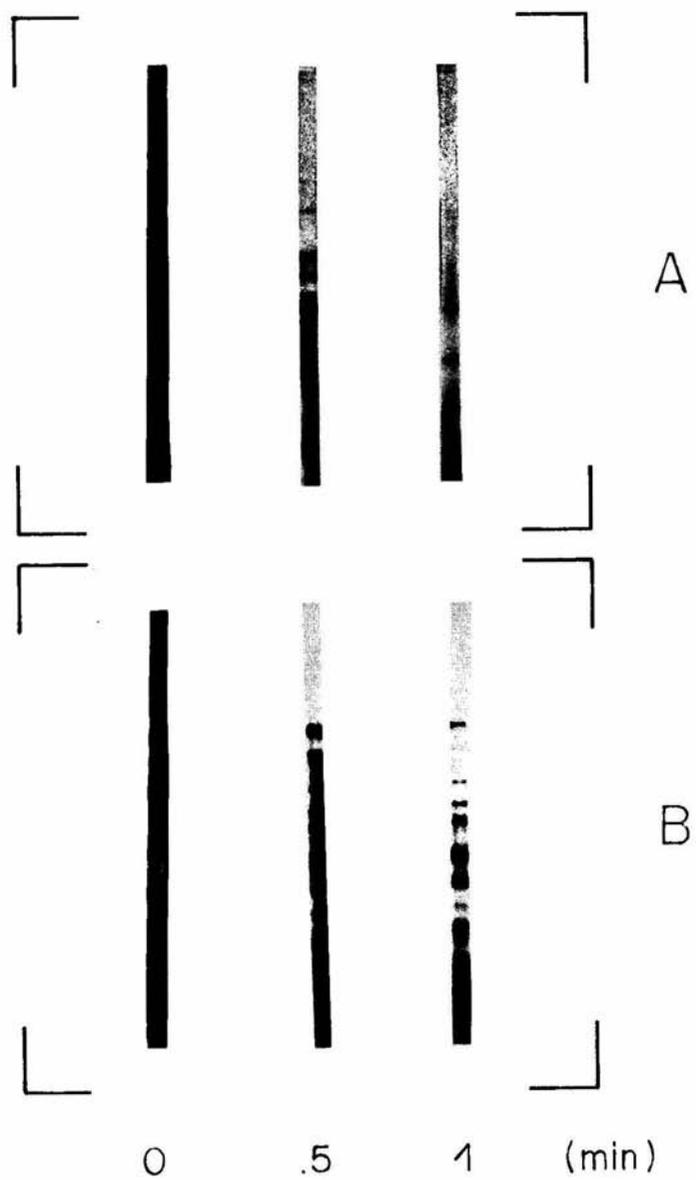


Fig. 15

Figura 16 - Identificación de las proteínas codificadas en la región b del bacteriófago lambda.

En la figura se muestran los autorradiogramas de geles de acrilamida - SDS de extractos de la cepa 159 irradiada durante 1 minuto e infectada con los bacteriófagos - $\lambda_{red114 imm434ts cII41}$ (A) y $\lambda_{b2\Delta red114 imm434ts cII41}$ (B) e incubada a 40°C. en presencia de 10 μ C de mezcla de aminoácidos- C^{14} , para cada caso durante 10 minutos.

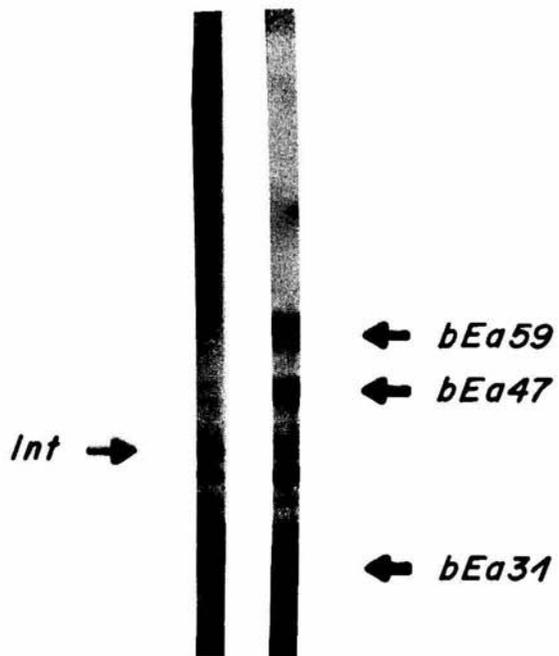


Figura 16

la desaparición de tres bandas en las células infectadas con el bacteriófago $\lambda_{b2\Delta}$, correspondientes a los pesos moleculares de 58Kd, 46Kd y 30Kd; por este criterio coincidentes con las proteínas bEa59, bEa47 y bEa31, reportadas previamente para dicha región (Epp C. y Pearson M., 1981).

- b) Análisis de las proteínas de la región b sintetizadas en condiciones de infección sib⁺/sibl.

Con el fin de determinar si alguna de las proteínas de la región b resultaba afectada por la presencia de sib, lo cual explicaría la diferencia observada en la tasa de eclosión; se procedió a realizar el experimento con la cepa 159 y los bacteriófagos λ_{sib}^+ y $\lambda_{sib}l$. Los extractos celulares radioactivos fueron analizados electroforéticamente.

El experimento, con su respectivo análisis densitométrico, se muestra en la Figura 17. Por los resultados obtenidos es difícil concluir si la cantidad de alguna de las proteínas de la región b varía de una infección a otra, por esta razón se analizaron los densitogramas por medio de la integración del área bajo la curva, utilizando el porcentaje relativo para cada uno de los picos (Tabla 8).

A partir de los porcentajes obtenidos para las proteínas de la región b, podemos decir que en el caso de bEa59 dichos valores son muy semejantes para ambas condiciones de infección; sin embargo, se mantiene ligeramente elevado en la condición sib⁺, con un cociente de los porcentajes relativos de 1.4, siendo esto reproducible. Para la proteína bEa31, el análisis no es practicable ya que comigra con otra --

Figura 17 - Análisis de proteínas en células infectadas con los bacteriófagos λ sib⁺ y λ sib1.

La figura muestra las autorradiografías y el análisis densitométrico correspondiente, obtenidos por electroforesis en geles de acrilamida - SDS de:

- A) Extractos de la cepa 159 infectada con el bacteriófago λ red114 imm434ts cII41.
- B) Extractos de la cepa 159 infectada con el bacteriófago λ sib1 red114 imm434ts cII41.

Fig. 17 A

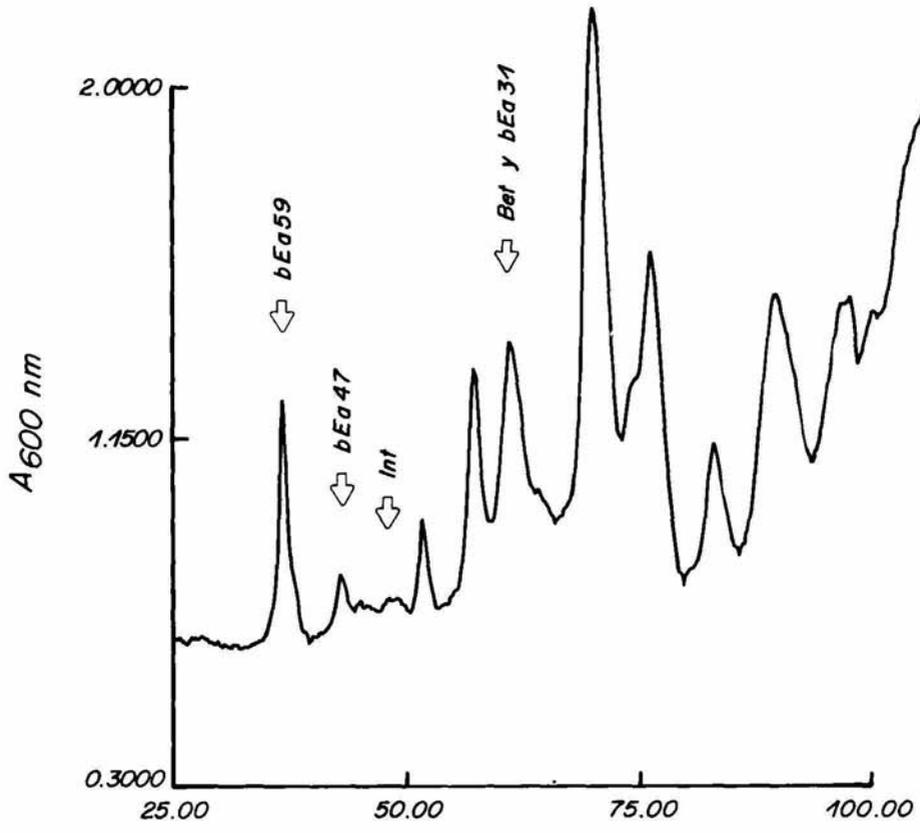


Fig. 17 B

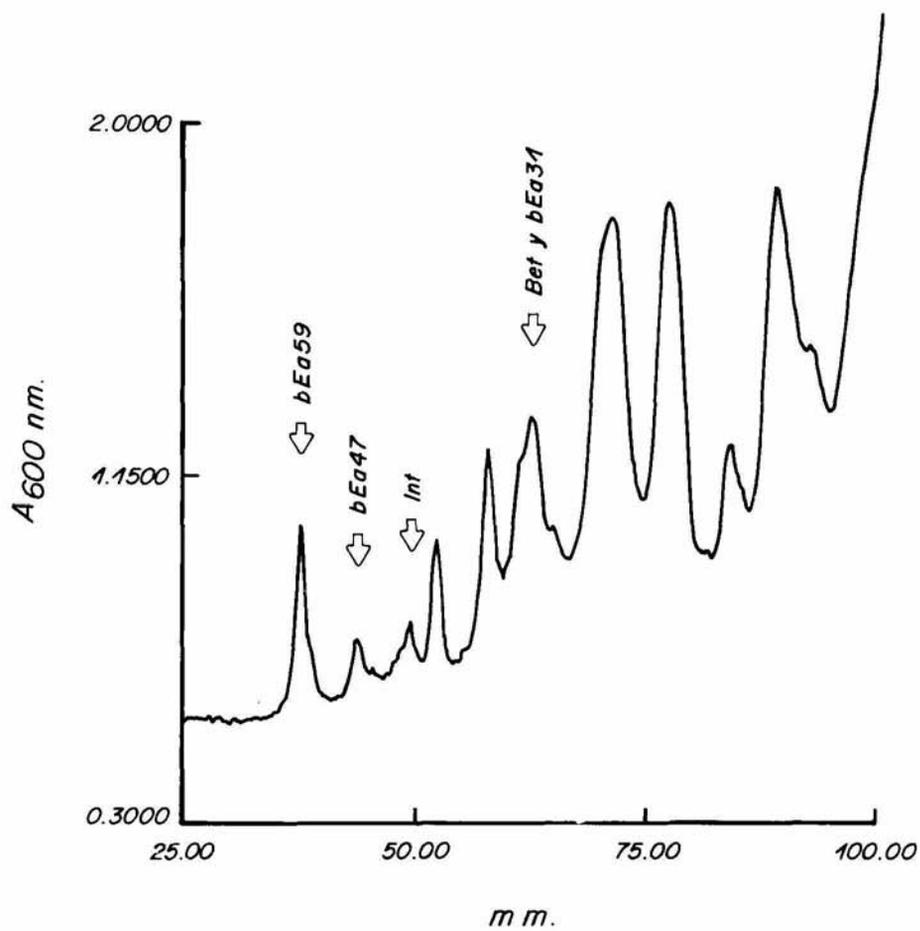


TABLA 8

CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS SINTETIZADAS
 DURANTE INFECCION LITICA POR EL BACTERIOFAGO
 λ red114 imm434ts cII41 Y λ sib1 red114 imm434
cII41

Proteína	Area (%)	
	λ <u>sib</u> ⁺	λ <u>sib1</u>
bEa59	7.50	5.31
bEa47	4.21	2.85
Int	1.84	3.44
Bet + bEa31	9.85	12.02

Los porcentajes del área bajo la curva se determinaron por integración de los densitogramas de la Figura 17, usando un computador integrado al espectrofotómetro Beckman, modelo DU-8.

proteína y este doblete no es discernido en la densitometría, pero curiosamente por la forma del pico pareciera que se encuentra incrementada en la condición sibl. Para la proteína bEa47 no es posible concluir sobre su porcentaje relativo ya que los valores obtenidos no fueron reproducibles en dos experimentos independientes. El control utilizado para este análisis fue la proteína Int, la cual sabemos que se encuentra disminuída en la infección λ sib⁺; el cociente de los porcentajes relativos para la proteína Int es de 0.53.

La proteína bEa59 fue la única analizada y sus valores de concentración relativa la convierten en candidato para ser el inhibidor de la producción de progenie; sin embargo, se mantiene la posibilidad de que bEa31 o bEa47 intervenga (n) en este efecto.

DISCUSION

Como se mencionó en la Introducción, el efecto de sib sobre la expresión de la integrasa ha sido ampliamente estudiado (Belfort 1980; Guarneros et al., 1982; Schindler y Echols 1981); sin embargo el efecto fisiológico de sib en el proceso general del desarrollo del bacteriófago lambda o la posibilidad de que afecte a otros genes, son aspectos que aún no han sido completamente aclarados. Por ello en el presente trabajo estudiamos la influencia del retro-regulador sobre el desarrollo lítico del bacteriófago lambda.

En la Tabla 1 (ver resultados) se mostró que los bacteriófagos λ_{sib1} y $\lambda_{b2\Delta}$ producen aproximadamente tres veces más progenie que el bacteriófago λ_{sib}^+ . Esta diferencia entre λ_{sib}^+ y λ_{sib1} resultó ser reproducible, en condiciones de inmunidad lambda (Tabla 2), durante infección o inducción del profago y condiciones c_{II41} ó, fenotípicamente, c_{II}^- (Tabla 3); del mismo modo se demostró que esta diferencia no se encuentra asociada al tiempo de maduración y liberación de partículas fágicas (Tabla 4).

Los resultados sugirieron que esta diferencia en la tasa de eclosión es inherente a un efecto inhibitorio de sib. Se consideró la posibilidad de que la región b estuviera involucrada en esta inhibición, dado que se ha observado que un bacteriófago $\lambda_{b2\Delta}$ produce un mayor número de partículas fágicas que el fago silvestre (Kellenberg 1961 y Tabla 1). Estos resultados habían sido explicados con anterioridad, bajo la consideración de que, al poseer un genoma de menor tamaño (la delección b2 elimina aproximadamente el 12% del DNA), el fago podía replicarse más rápido y, con un mayor número de copias, provocar

una eclosión mayor. Sin embargo el hecho de que un bacteriófago, que posee una mutación puntual en la región sib (λ sib1), provoque un efecto fenotípico λ b2 Δ en cuanto a producción de progenie, nos llevó a postular que es errónea la idea que el genoma de menor tamaño en el fago λ b2 Δ conduzca a una mayor eclosión. Alternativamente, postulamos que en la región b, existe un inhibidor de la producción de partículas fágicas y que a su vez es afectado por sib.

Esta hipótesis alternativa, fue apoyada por los resultados de los experimentos de tasa de eclosión con los bacteriófagos λ HindIII Δ sib⁺ y λ HindIII Δ sib1 (esta delección nos permite conservar el sitio retro-regulador y eliminar a partir de sib, el 8% del DNA sobre la región b; ver figura 13). Los resultados en la Tabla 4, demostraron que la diferencia en la tasa de eclosión desapareció al utilizar la delección HindIII, siendo los valores de eclosión muy semejantes a los de una infección λ b2 Δ ó λ sib1. Esto nos permitió decir que el inhibidor se localiza en la región b, en el segmento comprendido por la delección HindIII. Este inhibidor es afectado por sib.

Tratando de caracterizar al inhibidor, se llevó a cabo una prueba de complementación, la cual mostró que es un producto difusible dado que, la eclosión de los bacteriófagos λ HindIII Δ , se afecta cuando son complementados con los fagos λ sib⁺ y λ sib1, de manera que presentan el patrón diferencial ya establecido para estos bacteriófagos (ver Tabla 5). Por esta razón sugerimos que el inhibidor es una proteína codificada en la región b.

En base a los resultados anteriores, se consideró que sib afecta la expresión de algún gene localizado en la región b. Así pos

tuamos un papel dual para el retro-regulador, uno, inhibiendo la expresión de la integrasa (Guarneros et al., 1982) y otro favoreciendo la expresión del inhibidor de la región b (este trabajo).

Para apoyar el planteamiento anterior, se analizaron los porcentajes relativos de las proteínas de la región b en condiciones de infección λ sib⁺ y λ sib1 (Tabla 8). Encontramos que el porcentaje relativo de la proteína bEa59 se ve incrementado en condiciones de infección λ sib⁺ 1.4 veces. Así consideramos a esta proteína como un candidato para ser el inhibidor, cuya existencia fue mostrada por nuestros experimentos genéticos.

La proteína bEa59 presenta una serie de características que la hacen un buen candidato para ser el producto inhibitorio de la producción de progenie, como son:

1.- Es la primera proteína codificada a la izquierda del retro-regulador, por lo tanto puede ser fácilmente regulada por sib.

2.- Se ha descrito que esta proteína, por un lado inhibe el empaquetamiento del DNA de lambda "in vitro", en ausencia del pg FI; por otro lado presenta actividad de endonucleasa sobre DNA de doble cadena, requiriendo como cofactores DNA de cadena sencilla, ATP y Mg²⁺. (No se ha demostrado si la inhibición del empaquetamiento es resultado de rupturas en el DNA de lambda por la actividad endonucleotídica) (Summer-Smith et al., 1982; Benchimol et al., 1982a; Benchimol et al., 1982b).

3.- Nuestros resultados muestran que la concentración (medida como porcentaje relativo) de la proteína bEa59 es mayor en condiciones de infección λ sib⁺.

Aunque no existen evidencias de la actividad de la proteína bE "in vivo", dados nuestros resultados y la evidencia de su actividad "in vitro", postulamos el siguiente modelo:

En condiciones de infección λ_{sib}^+ el corte por RNAsaIII estabilizaría al RNA mensajero provocando la acumulación de la proteína bEa59, ésta inhibiendo el empaquetamiento, conduciría a una disminución en la producción de progenie.

Finalmente, consideramos que sería prematuro decir que la proteína bEa59 es la única responsable de este efecto, dado que nuestros resultados no son concluyentes para las otras dos proteínas de la región b. El estudio de mutaciones en el gen bEa59, permitirá establecer si esta proteína es el único factor responsable del efecto inhibitorio descrito en el presente trabajo.

B I B L I O G R A F I A

- Adhya, S., Gottesman, M., De Crombrughe, B. y Court, D. (1976).
Transcription termination regulates gene expression, in RNA polymerasa. (R. Losick and M. Chamberlin eds.) 719. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring -- Harbor, New York.
- Appeleyard, R.L. (1954).
Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from E. coli K-12. Genetics 39: 440.
- Belfort, M., Wulff, D. y Oppenheim, A.B. (1975).
Isolation, characterization and deletion mapping of amber mutations in the cII gene of phage lambda. Virology 63: 147.
- Belfort, M. (1980).
The cII-independent expression of the phage lambda int gene in RNAsa III-defective E. coli. Gene 11: 149.
- Benchimol, S., Lucko, H. y Becker, A. (1982).
Bacteriophage λ DNA packaging in vitro. J. Biol. Chem. 257: 5201.
- Benchimol, S., Lucko, H. y Becker, A. (1982).
A novel endonucleasa specified by bacteriophage λ . J. Biol. Chem. 257: 5211.
- Chowdhury, M.R., Dunbar, S. y Becker, A. (1972).
Induction of an endonuclease by some substitution and deletion variants of phage lambda. Virology 49: 314.
- Court, D., Green, L. y Echols, H. (1975).
Positive and negative regulation by the cII and cIII gene products of bacteriophage lambda. Virology 63: 484.
- Court, D., Adhya, S., Nash, H. y Enquist, L. (1977).
The phage lambda integration protein int is subject to control by the cII and cIII gene products, in DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes. (Bukhari, A.I., Shapiro, J.A. and Adhya, S.L. eds.). Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York. 389.
- De Crombrughe, B., Mudryj, M., Di Lauro, R. y Gottesman, M.E. (1979).
Specificity of the bacteriophage N gene product (pN) Nut sequences are necessary and sufficient for determination. Cell 18: 1145.
- Dove, W.F., Hargrove, E., Ohashi, M., Haugli, F. y Guha A. (1969).
Replicator activation in lambda. Japan J. Genet. 44: suppl. 1: 11.
- Echols, H. (1972).
Developmental pathways for the temperate phage: Lysis vs. Lysogeny. Ann. Rev. Genet. 6: 157.
- Echols, H. y Green, L. (1971).
Establishment and maintenance of repression by bacteriophage lambda: the role of the cI, cII and cII proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 68: 190.

- Emr, S.D., Schwartz, M. y Silhavy, T.J. (1978).
Mutations altering the cellular localization of the phage lambda receptor,
an *E. coli* outer membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 5802.
- Enquist, L.W. y Szybalsky, W. (1978).
Coliphage lambda as a safe vector for recombinant DNA experiments, in
Viruses and Environmente. (Kurstak, E. and Maramorosch, K. eds.) Acad.
Press, New York. 625.
- Epp, C., Pearson, M. y Enquist, L.W. (1981).
Int protein in bacteriophage lambda: cis-dominant inhibition of synthesis
by the *b*-region. *Gene* 13: 327.
- Feiss, M., Adhya, S. y Court, D. (1972).
Isolation of a plaque forming, galactose transducing strain of phage lambda.
Genetics 71: 189.
- Friedman, D.I., Jolly, C.T. y Mural, R.J. (1973).
Interference with the expression of the N gene function of phage lambda in
a mutant of *E. coli*. *Virology* 51: 216.
- Friedman, E.I., Baumann, M.F. y Baron, L.S. (1976).
Cooperative effects of bacterial mutations affecting lambda N gene expression
I. Isolation and characterization of a nus B mutant. *Virology* 73: 119.
- Friedman, D.I., Schauer, A.T., Baumann, M.R., Baron, S.L. y Adhya, S. (1981).
Evidence that ribosomal protein S 10 participates in control of transcription
termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1115.
- Furth, M.E., Blattner, F.R., Mc Leester, C. y Dove, W.F. (1977).
Genetic structure of the replication origin of bacteriophage lambda. *Sci.* 198: 1046.
- Guarneros, G. y Echols, H. (1973).
Thermal asymmetry of site specific recombination by bacteriophage lambda.
Virology 52: 30.
- Guarneros, G. y Galindo, J.M. (1979).
The regulation of integrative recombination by the *b*₂ region and the *c*II gene
of bacteriophage lambda. *Virology* 95: 119.
- Guarneros, G., Montañez, C., Hernández, T. y Court, D. (1982).
Postranscriptional control of bacteriophage lambda int gene expression from a
site distal to the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 238.
- Gottesman, M., Oppenheim, A. y Court, D. (1982).
Retroregulation: control of gene expression from sites distal to the gene.
Cell 29: 727.
- Gottesman, M. y Yarmolinsky, M. (1968).
Integration-negative mutants of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 140: 57.
- Heinemann, S.F. y Spiegelman, W.G. (1970).
Control of transcription of the repressor gene in bacteriophage lambda. *Proc.*
Natl. Acad. Sci. 67: 1122.

- Wang, A.P. y Dove, W.F. (1971).
Termination to lambda. In: Hershey, A.D. (ed.), The Bacteriophage Lambda,
1971 Spring Lect. Ser. Lab., Cold Spring Harbor, New York. 3.
- Hershey, A.D. y Hagen, D. (1980).
The lysis-lysogeny decision of phage lambda: explicit programming and
responsiveness. *Ann. Rev. Genet.* 14: 599.
- Holmes, W.M., Platt, T. y Rosenberg, M. (1983).
Termination of transcription in *E. coli*. *Cell*. 32: 1029.
- Johnson, A.D., Meyer, B.J. y Ptashne, M. (1978).
Mechanism of action of the cro protein of bacteriophage lambda. *Proc. Natl.
Acad. Sci.* 75: 1785.
- Katzir, N., Oppenheim, A., Belfort, M. y Oppenheim, A.B. (1976).
Activation of the lambda int gene by the cII and cIII gene products.
Virology 74: 324.
- Kellenberg, G., Zichichi, M.L. y Weigle, J. (1961).
A mutation affecting the DNA content of bacteriophage lambda and its lysogenizing
properties. *J. Mol. Biol.* 3: 399.
- Kellenberg, E. y Edgar, R.S. (1971).
Structure and assembly of phage particles. In Hershey, A.D. (ed.). The Bacteriophage
lambda. Cold Spring Harbor, New York. 271.
- Kourilsky, P. (1973).
Lysogenization by bacteriophage lambda multiple infection and the lysogenic
response. *Mol. Gen. Genet.* 122: 183.
- Lehli, U.K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage
lambda. *Nature* 227: 680.
- Ledemberg, E.M. (1951).
Lysogenicity in *E. coli* K-12. *Genetics* 56: 560.
- Lewin, B. (1977).
Phage lambda: ineffective pathways in Gene Expression. Vol. 3. (John Wiley and
sons eds.)
- Liedke-Kulke, M. y Kaiser, A.A. (1967).
Genetic control of phage insertion specificity in bacteriophage lambda and lambda.
Virology 32: 465.
- Lozaron, H.A., Dahlberg, J.E. y Szybalsky, W. (1976).
Processing of the major leftward mRNA of coliphage lambda. *Virology* 71: 262.
- Manly, K.F., Sanger, E.R. y Radding, C.M. (1969).
Nonessential functions of bacteriophage lambda. *Virology* 41: 177.
- Maurer, R., Meyer, B.J. y Ptashne, M. (1980).
Gene regulation at the right operator (O_R) of phage lambda: cII and autogenous
negative control by repressor. *J. Mol. Biol.* 130: 119.

- McMacken, R., Mantei, N., Butler, B., Joyner, A. y Echols, H. (1970).
Effect of mutations in the *cII* and *cIII* genes of bacteriophage lambda on
macromolecular synthesis in infected cells. *J. Mol. Biol.* 49: 639.
- Meyer, B.J., Maurer, R., Ptashne, M. (1980).
Gene regulation at the right operator (*O_R*) of phage lambda II. *O_{R1}*, *O_{R2}* and
O_{R3}: their roles in mediating the effect of repressor and Cro. *J. Mol. Biol.*
139: 163.
- Meyer, B.J. and Ptashne, M. (1980).
Gene regulation at the right operator (*O_R*) of phage lambda III. Lambda repressor
directly activates gene transcription. *J. Mol. Biol.* 139: 195.
- Montañez, C. (1982).
Aislamiento y caracterización de mutantes del bacteriófago lambda que carecen
del retro-inhibidor *sib*. Tesis Doctoral I.P.N. México.
- Oppenheim, A. y Oppenheim, A.B. (1978).
Regulation of the *int* gene of bacteriophage lambda: activation by the *cII* and
cIII gene products and the role of the *P_I* and *P_L* promoters, *Molec. Gen.*
Genet. 168: 39.
- Parkinson, J.S. y Huskey, R.J. (1971).
Deletion mutants of bacteriophage lambda I. Isolation and characterization.
J. Mol. Biol. 56: 369.
- Ptashne, M. (1967).
Isolation of the lambda phage repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57: 306.
- Reichard, L.F. (1975).
Control of bacteriophage lambda repressor synthesis: regulation of the
maintenance pathway by the *cro* and *cI* products. *J. Mol. Biol.* 93: 289.
- Reichard, L.F. y Kaiser, A.D. (1971).
Control of lambda repressor synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68: 2185.
- Roberts, J.W. (1969).
Termination factor for RNA synthesis. *Nature* 224: 1168.
- Rosenberg, M., Court, D., Wulff, D.L., Shimatake, H. y Brady, C. (1978).
The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic
regulatory region in phage lambda. *Nature* 272: 414.
- Salstrom, J.S. y Szybalsky, W. (1978).
Coliphage *nutL*⁻: a unique class of mutants defective in the site of N utilization
for antitermination of leftward transcription. *J. Mol. Biol.* 195: 221.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, F.G., Hill, D.F. y Petersen, G.B. (1982).
Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.* 162: 729.
- Schindler, M.J., Hallick, I.M., Echols, H. y Singer, E.R. (1970).
Properties of recombination deficient mutants of bacteriophage lambda. *J. Mol.*
Biol. 52: 501.

- Singer, E.R. y Weil, J. (1968).
Recombination in bacteriophage lambda mutants deficient in general recombination.
J. Mol. Biol. 34: 261.
- Singer, E.R. (1970).
On the control of lysogeny in the phage lambda. Virology 90: 624.
- Sussman, R. y Jacob, F. (1962).
Sur un système de repression thermosensible chez le bacteriophage lambda
d' E. coli. Compt. Rend. Acad. Sci., 254: 1517.
- Summer-Smith, M., Benchimol, S., Murialdo, H. y Becker, A. (1982).
The gene ben of bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 160: 23.
- Takeda, Y. (1979).
Specific repression of in vitro transcription by the cro repressor of bacteriophage
lambda. J. Mol. Biol. 160: 23.
- Ward, D.F. y Murray, E.N. (1979).
Convergent transcription in bacteriophage lambda: Interference with gene expression.
J. Mol. Biol. 133: 249.
- Williams, B.G. y Blattner, F.R. (1979).
Construction and characterization of the hybrid bacteriophage lambda charon
vectors for DNA cloning. J. Virol. 29: 555.
- Weisberg, R.A., Gottesman, S. y Gottesman, M.E. (1977).
Bacteriophage lambda: The lysogenic pathway. In: "Comprehensive Virology"
(Frankel, H. Conrat and Wagner, E.R. eds.) Vol. 8, 197. Plenum Press, New York.
- Yarmolonsky, M.B. (1971).
Making and joining DNA ends. In Bacteriophage Lambda. (Hershey, A.D. ed.)
Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Yen, K.M. y Gussin, G.N. (1973).
Genetic characterization of a P_{RM} mutant of bacteriophage lambda. Virology
56: 300.