



E.N.E.P.I. U.N.A.M.

U.D.C./PROCESOS TÉCNICOS

PAPEL...



Escuela Nacional de Estudios Profesionales

"I Z T A C A LA CAMPUS  
ALA

ANÁLISIS DE LA ANTITERMINACIÓN DE LA  
TRANSCRIPCIÓN DEL BACTERIOFAGO LAMBDA  
EN UNA CEPA DE Escherichia coli CON LA RNA  
POLIMERASA MODIFICADA

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

BULMARO CISNEROS VEGA



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.

ANALISIS DE LA EFICIENCIA DE LA ANTITERMINACION DE LA  
TRANSCRIPCION DEL BACTERIOFAGO LAMBDA EN UNA CEPA DE  
Escherichia coli CON LA RNA POLIMERASA MODIFICADA

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE GENETICA  
Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ES-  
TUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL. BAJO  
LA DIRECCION DE LA DRA. CECILIA MONTANEZ



A MI PAPA: Por su ejemplo

A MI MAMA: Con todo mi amor

A MIS HERMANOS: Luis, Armando, Jorge y Alma Rosa

A LA QUERIDISIMA MEMORIA DE MI HERMANO JAIME

A EL RECUERDO DE: Mi abuelita

A ALE: Por todo lo que me ha inspirado

A: Todos mis amigos

## AGRADECIMIENTOS

Con cariño a la Dra. Cecilia Montañez, por sus enseñanzas en el campo de la investigación y por su amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Juan Alfredo, Carlos, Silvia, Ismael, Lulú, Isabel, Alejandra, Yolanda, Victor y Astrid. Especialmente a Aurelio y Javier por su ejemplo y su amistad.

A Elias García, por la eficiente preparación de los medios de cultivo.

A Rebeca Barrera, por su ayuda en los aspectos mecanográficos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico.

## CONTENIDO

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	29
Cepas bacterianas.....	29
Bacteriófagos.....	29
Medios de cultivo y soluciones.....	29
Propagación de bacteriófagos por infección en medio líquido.....	31
Titulación de lisados fágicos.....	31
Crecimiento mucoide de las cepas lon <sup>-</sup> .....	32
Sensibilidad bacteriana a antibióticos.....	32
Inducción de la filamentación.....	32
Transducción generalizada mediada por el bacteriófago Plcm.....	33
Selección de cepas proC <sup>-</sup> .....	34
Extracción de DNA de plásmido.....	35
Cuantificación de DNA.....	35
Transformación de E. coli.....	36
RESULTADOS	
I. Identificación de bacteriófagos con fenotipo Mar..	41
II. Caracterización de cepas bacterianas lon <sup>-</sup> .....	44
a) Morfología colonial de las cepas lon <sup>-</sup> .....	45

b)	Inhibición del crecimiento de cepas lon <sup>-</sup> por nitrofurantoina.....	45
c)	Inducción de filamentación por radiación con luz ultravioleta.....	48
III.	Construcción de cepas bacterianas.....	60
a)	Construcción de la cepa ron <sup>-</sup> lon <sup>-</sup> .....	63
b)	Construcción de la cepa ron <sup>+</sup> lon <sup>-</sup> .....	73
IV.	Caracterización de las cepas transductantes ron <sup>+</sup> /lon <sup>-</sup> .....	76
a)	Inhibición del crecimiento de las cepas ron <sup>+</sup> lon <sup>-</sup> y ron <sup>-</sup> lon <sup>-</sup> por nitrofurantoina.....	76
b)	Filamentación de las cepas ron <sup>+</sup> lon <sup>-</sup> y ron <sup>-</sup> lon <sup>-</sup> por luz U.V.....	79
V.	Efecto de las mutaciones ron <sup>-</sup> lon <sup>-</sup> en el desarrollo de bacteriófagos con fenotipo Mar.....	79
VI.	Antiterminación de la transcripción en cepas lon <sup>+</sup> /lon <sup>-</sup> .....	89
VII.	Actividad de la proteína N7 en la antiterminación de la transcripción.....	93
VIII.	Construcción de cepas con supresor F de mutaciones ambar.....	97
IX.	Construcción de cepas con supresor U de mutaciones ambar.....	100
X.	Supresión del fenotipo Mar en el bacteriófago λ N7..	100
XI.	Efecto de la mutación lon en la actividad de las proteínas N7 y Nmar3.....	109
	DISCUSION.....	112
	CONCLUSIONES.....	119
	BIBLIOGRAFIA.....	120

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Origen de las mutaciones mar.....	15
TABLA 2. Supresión del fenotipo Mar por la mutación lon.....	26
TABLA 3. Cepas bacterianas.....	38
TABLA 4. Bacteriófagos y plásmidos.....	40
TABLA 5. Caracterización de bacteriófagos con fenotipo Mar.....	42
TABLA 6. Morfología colonial de las cepas lon <sup>-</sup> .....	46
TABLA 7. Inhibición del crecimiento de cepas lon <sup>-</sup> por nitrofurantoina.....	49
TABLA 8. Inducción de filamentación por radiación con luz ultravioleta.....	52
TABLA 9. Caracterización de cepas bacterianas pro <sup>+</sup> y proC <sup>-</sup> .....	65
TABLA 10. Sensibilidad de las cepas bacterianas a tetraciclina.....	67
TABLA 11. Resistencia a cloramfenicol de las cepas bacterianas lisógenas para P1 cm.....	69
TABLA 12. Inhibición del crecimiento de las cepas ron <sup>+</sup> lon <sup>-</sup> y ron <sup>-</sup> lon <sup>-</sup> por nitrofurantoina.....	77
TABLA 13. Filamentación de las cepas ron <sup>+</sup> lon <sup>-</sup> y ron <sup>-</sup> lon <sup>-</sup> inducidas por luz ultravioleta.....	80
TABLA 14. Efecto de las mutaciones ron <sup>-</sup> lon <sup>-</sup> en el desarrollo de bacteriófagos con fenotipo Mar.....	87
TABLA 15. Efecto de la RNA polimerasa ron <sup>-</sup> en la eficiencia de plaqueo de dos bacteriófagos lambdoides λci1857 y λimm434r32.....	91
TABLA 16. Actividad de la proteína N7 en la antiterminación de la transcripción.....	94
TABLA 17. Supresión de mutaciones ambar.....	98

TABLA 18. Supresión del fenotipo Mar en el bacteriófago N7.....	106
TABLA 19. Efecto de la mutación lon en la actividad de las proteínas N7 y Nmar3.....	110

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Mapa genético del bacteriófago .....	7
FIGURA 2.	Localización genética de las mutantes mar.....	15
FIGURA 3.	Modelo para antiterminación de la transcripción del bacteriófago .....	18
FIGURA 4.	Estabilidad de la proteína N del bacteriófago $\lambda$ en cepas bacterianas $lon^+$ y $lon^-$ .....	24
FIGURA 5.	Morfología de las cepas $lon^+$ .....	54
FIGURA 6.	Morfología de las cepas $lon^-$ .....	56
FIGURA 7.	Morfología de las cepas $lon^+$ irradiadas con luz U.V.....	58
FIGURA 8.	Morfología de las cepas $lon^-$ irradiadas con luz U.V.....	61
FIGURA 9.	Construcción de la cepa $ron^- lon^-$ .....	71
FIGURA 10.	Construcción de la cepa $ron^+ lon^-$ .....	74
FIGURA 11.	Filamentación en las cepas transductantes $ron^+ lon^-$ .....	82
FIGURA 12.	Filamentación en la cepa transductante $ron^- lon^-$ .....	84
FIGURA 13.	Construcción de cepas con supresor F de mutaciones ambar.....	101
FIGURA 14.	Construcción de cepas con supresor U de mutaciones ambar.....	103

RESUMEN

La proteína N (PN) del bacteriófago lambda, juega un papel esencial durante la antiterminación de la transcripción, esta proteína forma un complejo con la RNA polimerasa de E. coli e impide que esta enzima reconozca algunos sitios terminadores de la transcripción. Varios autores han sugerido que la estabilidad de pN puede ser un factor importante para que ocurra antiterminación de la transcripción.

En este trabajo se analizó la importancia de la estabilidad de pN en el proceso de antiterminación de la transcripción utilizando un sistema "in vivo". En los estudios realizados se modificaron tanto la estabilidad de pN (por medio del uso de cepas bacterianas lon<sup>+</sup> y lon<sup>-</sup>), como la eficiencia de formación del complejo RNA polimerasa-pN (empleando mutaciones Nmar y ron).

Como primer punto se llevó a cabo la construcción de las cepas isogénicas ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup>, ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup>, ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup>, ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>, ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup>sup<sup>+</sup>, ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup>sup<sup>+</sup> y ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>+</sup>. Estas cepas se utilizaron para analizar el desarrollo de bacteriófagos con una proteína N modificada (mar1, mar3, mar4, N7 y N53).

Los resultados obtenidos muestran que la interacción deficiente entre la RNA polimerasa ron<sup>-</sup> y pNmar1 ó pNmar4 no es suprimida por un aumento en la estabilidad de pN. Sin embargo, los complejos formados por la RNA polimerasa ron<sup>-</sup> y las proteínas N7 ó Nmar3 son funcionales en condiciones donde la vida media de pN es más larga.

Estos resultados sugieren que durante la antiterminación de la transcripción es necesario tanto una interacción eficiente entre la RNA polimerasa y pN como cantidades suficientes de la proteína antiterminadora en el sistema.



## INTRODUCCION

Los seres vivos funcionan de una manera ordenada, a pesar de su alto grado de complejidad. Dentro de la célula miles de reacciones químicas están controladas por diferentes mecanismos regulatorios, como son: el control de la expresión genética, la proteólisis, el transporte extracelular, etc.

El estudio de la expresión genética de los organismos procarióticos ha sido abordado por un gran número de investigadores, debido a la relativa simplicidad de su aparato genético. En estos organismos, uno de los niveles más importantes de regulación de la expresión genética es la transcripción (39).

La transcripción es un proceso central dentro del crecimiento celular, mediante el cual, la información genética codificada en el ácido desoxiribonucleico (DNA) es transferida a otra molécula, el ácido ribonucleico (RNA). Este proceso está muy bien caracterizado en la bacteria E. coli en donde se sabe que la enzima RNA polimerasa (RNAPol) es la encargada de llevar a cabo la transcripción, esta enzima es dependiente de DNA para su funcionamiento, y está constituida por 5 subunidades: alfa (2), beta (1), beta prima (1) y sigma (1) (39).

Las 2 subunidades alfa tienen un peso molecular de 36.512 kilodaltones (Kd) la subunidad beta pesa 150.619 Kd, la beta

prima 155.162 Kd, y la subunidad sigma pesa 85.0 Kd. Cuando la RNA polimerasa está formada por las 5 subunidades se le conoce como "Holoenzima" y cuando sigma se desprende de ella se la llama "core". La transcripción se ha dividido de manera global en 3 fases: iniciación, elongación y terminación.

La iniciación ocurre cuando la "holoenzima" reconoce una región específica en el DNA denominada promotor. Para que esto ocurra es esencial la participación de sigma, sin ella no se lleva a cabo la interacción específica (31). En esta fase, el control de la expresión genética se da por medio de proteínas reguladoras, como son: los represores y proteínas activadoras o inductoras. Las primeras se unen a una región del promotor llamada operador, impidiendo la iniciación de la transcripción a través de la regulación negativa del proceso. Las proteínas activadoras regulan positivamente la iniciación (31).

Durante la elongación la RNA polimerasa cataliza la unión de ribonucleótidos al extremo 3' OH de la cadena de RNA nascente, mediante la formación de enlaces fosfodiéster. La subunidad sigma se libera de la enzima cuando la cadena alcanza una longitud de aproximadamente 9 nucleótidos y el "core" continúa deslizándose a lo largo del molde de DNA hasta completar la síntesis de la molécula de RNA. Al complejo que se forma entre el DNA, el "core" y la cadena de RNA se le denomi-

na complejo ternario.

La terminación de la cadena de RNA en síntesis se presenta cuando la RNAPol alcanza un sitio característico en el DNA, conocido como terminador; en este momento cesa la elongación y el complejo ternario se disocia.

Uno de los modelos biológicos más favorecidos para el estudio de la regulación en la expresión genética, es el formado por la bacteria E.coli y su huésped natural el bacteriófago lambda.

Debido a su relativa simplicidad, así como a la presencia de diversos mecanismos de regulación que actúan en su desarrollo, aunado a la gran variedad de cepas mutantes existentes; el estudio genético del bacteriófago lambda, ha sido clave para el entendimiento de fenómenos biológicos, como; la morfogénesis, los sistemas de recombinación, y el control transcripcional, entre otros.

El bacteriófago lambda está estructuralmente compuesto por una cabeza icosaédrica de 0.05  $\mu$ m de diámetro, que contiene a una molécula de DNA de doble cadena, y una cola de 0.5  $\mu$ m de longitud por medio de la cual se adsorbe a su hospedero. A nivel molecular su composición corresponde a un 50% de DNA y 50% de proteína.

Este bacteriófago pertenece al grupo de los virus temperados, los cuales, presentan 2 ciclos de vida, el lisogénico y el lítico. Durante el ciclo lítico, el bacteriófago se adsorbe a la superficie de la bacteria, inyecta su DNA y comienza a utilizar la maquinaria metabólica del hospedero para dirigir tanto la replicación autónoma de su genoma como su empaquetamiento dentro de nuevas partículas víricas; finalmente estas partículas son liberadas al exterior mediante lisis celular provocada por el mismo virus. Durante el ciclo lisogénico, se lleva a cabo la síntesis de productos fágicos, que dirigen la inserción del DNA viral dentro del cromosoma bacteriano y que controlan la represión de la mayoría de las funciones virales; de esta forma el genoma del bacteriófago puede duplicarse bajo el control de la replicación bacteriana y persistir en este estado por varias generaciones. Al DNA del bacteriófago que se encuentra formando parte del genoma bacteriano se le denomina profago y a la bacteria que lo porta, lisógena.

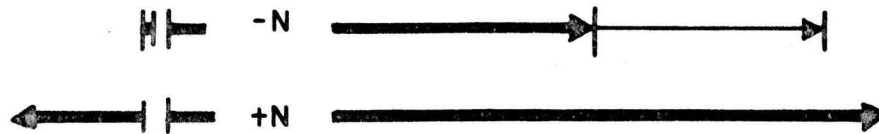
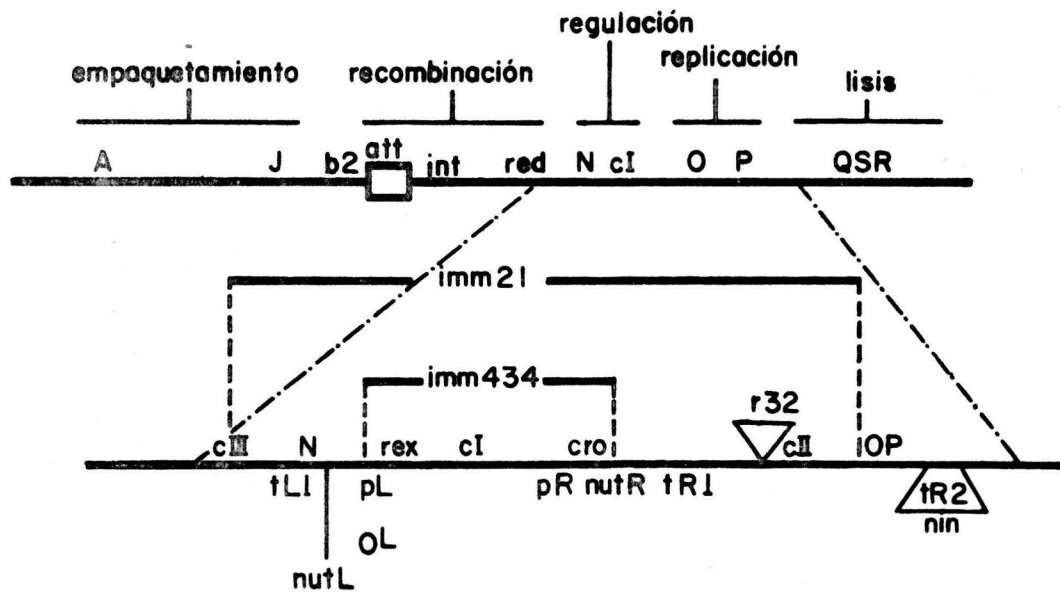
La transcripción del bacteriófago lambda se encuentra regulada tanto en su iniciación, como a nivel de la terminación. Durante la iniciación de la transcripción, la RNA polimerasa bacteriana reconoce a los promotores virales y comienza su acción, sin embargo existen productos virales que influyen en la actividad de la enzima y regulan tanto negativa como positivamente el proceso. La terminación de la transcripción se presenta cuando la RNA polimerasa reconoce los sitios

terminadores presentes en el DNA viral. Estos sitios se caracterizan por presentar una región de simetría diaxial que permite la formación en el RNA mensajero de una estructura de tallo y burbuja

Los terminadores del bacteriófago lambda se han clasificado como dependientes e independientes de Rho, en base a la necesidad que presentan para su funcionamiento del factor bacteriano de terminación Rho.

El mecanismo regulatorio más importante durante la terminación de la transcripción en el bacteriófago lambda, es el de antiterminación de la transcripción. Durante la transcripción temprana de bacteriófago, la RNA polimerasa inicia su acción en los promotores virales pL (promotor de la izquierda) y pR (promotor de la derecha). Esta transcripción llega a su fin eventualmente en los terminadores tL<sub>1</sub> y tR<sub>1</sub> (terminadores de la izquierda y derecha, respectivamente). Si la RNA polimerasa se detuviera permanentemente en estos sitios, los genes que están situados después de estos terminadores, y que son esenciales para el desarrollo lítico de bacteriófago no se transcribirían. Lo anterior se evita mediante la función de antiterminación de la transcripción. A partir de pL se transcribe el gen N cuyo producto, la proteína N (pN), permite a la RNA polimerasa ignorar los sitios de terminación y continuar su lectura hasta los genes distales ya mencionados (Figura 1) (31, 26, 4, 13, 9).

FIGURA 1. Mapa genético del bacteriófago  $\lambda$ . En la Figura se muestra la organización del genoma del bacteriófago en unidades funcionales. En la sección ampliada se observa la organización de la región de inmunidad del bacteriófago  $\lambda$ , mostrándose las porciones no compartidas entre las regiones de inmunidad de los bacteriófagos  $\lambda$ ,  $\lambda 21$  y  $\lambda 434$ . Se muestran además los patrones de la transcripción temprana, tanto en ausencia como en presencia de pN. A partir de el promotor pL se transcribe el gen N cuyo producto, la proteína N, interactúa con una serie de factores que le permiten ejercer una acción antiterminadora logrando que la RNA polimerasa transcriba genes más allá de los terminadores. En ausencia de pN la transcripción concluye en los terminadores de la transcripción tL1 y tR1.



En un principio se pensó que pN antagonizaba el funcionamiento del factor Rho para impedir la terminación de la transcripción, actualmente se sabe que actúa en terminadores dependientes como independientes de Rho (31, 19, 51).

También se ha reportado la existencia de dos sitios característicos en el DNA del bacteriófago lambda, que son necesarios para el funcionamiento de pN, a los cuales se les ha denominado nut (región de uso de N). Estos sitios se localizan después de los promotores pL y pR, y se denominan más específicamente nutL y nutR, respectivamente. Ambos sitios presentan una secuencia consenso que consiste de 16-17 pares de bases (pb) (26), nutL se localiza a 48 pb de pL y por su parte nutR a 243 pb de pR (13).

Para que pN realice su función no se necesita de la presencia de un promotor específico, sin embargo es indispensable que se encuentre en el sistema el sitio nut (26, 6, 35), mutaciones virales en nutL y nutR bloquean la antiterminación de la transcripción (26, 13, 51). No obstante que está claro la importancia de los sitios nut para la actividad de pN, no se sabe a ciencia cierta su función.

En cuanto al mecanismo por medio del cual pN permite que la RNA polimerasa ignore a los terminadores de la transcripción no se conoce con exactitud, sin embargo existen evidencias genéticas y bioquímicas que postulan la interacción de pN con



factores bacterianos y con la RNA polimerasa.

Los factores bacterianos que se han reportado como necesarios para la antiterminación de la transcripción son las proteínas Nus. Los genes que codifican para estas proteínas se han mapeado en 5 loci; nusA (minuto 68 del cromosoma bacteriano), nusB (minuto 11) nusC (minuto 88) nusD (minuto 74) y nusE (minuto 72). Aunque estos genes se localizan en diferentes sitios del cromosoma bacteriano, se les ha agrupado bajo el calificativo de nus (proteínas necesarias para el uso de N) por la relación que mantienen con pN (24, 31, 7, 14, 8, 4, 5, 7).

Las cepas mutantes nus fueron aisladas en base a la deficiencia que presenta el bacteriófago  $\lambda$  para desarrollarse en estas bacterias (26, 24, 14). Cepas bacterianas con más de 1 mutación nus presentan un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento del bacteriófago  $\lambda$ , con respecto a las bacterias que poseen una sola de estas mutaciones (4, 5, 24).

Las mutantes nus no alteran la síntesis de pN, lo que sugiere que su acción es sobre la actividad antiterminadora de esta proteína (7, 56).

La proteína NusA es la que se encuentra más caracterizada en cuanto a su función antiterminadora. Esta proteína presenta afinidad tanto por pN como por la RNA polimerasa (26, 24).

La proteína NusA se une a pN, en una columna de afinidad que contiene a pN unida covalentemente a sefarosa (24, 26). Asimismo existe un bacteriófago  $\lambda$  mutante en pN que es capaz de crecer en una cepa nusA<sup>-</sup>. Los resultados anteriores sugieren una interacción directa entre pN y la proteína NusA, durante la antiterminación de la transcripción.

Por otra parte NusA también muestra afinidad por la RNA pol. En una columna de afinidad, que tiene a la proteína NusA unida covalentemente a sefarosa, el "core" de la RNA polimerasa se une específicamente a la columna y cuando posteriormente se agrega la subunidad sigma, la Holoenzima eluye de la columna (24). Se ha observado también que en un sistema "in vitro" NusA ocasiona que la RNA polimerasa lleve a cabo una pausa en el terminado TR<sub>2</sub> de  $\lambda$  en ausencia de Rho, y que en el operón bacteriano para el triptofano cooperan con Rho para lograr la terminación de la transcripción (24). En base a estos resultados Greenblatt postuló que NusA puede actuar como una subunidad más de la RNA polimerasa, con función reguladora tanto de la elongación como de la terminación de la transcripción; sustituyendo a sigma una vez que la transcripción se ha iniciado (24).

Considerando lo que se conoce de NusA, en cuanto a su acción terminadora de la transcripción, es probable que pN necesite interactuar con NusA para anular el efecto terminador de esta proteína, y al mismo tiempo poder ejercer su propia acción antiterminadora de la transcripción (24, 8).

En cuanto a la interacción entre pN y la RNAPol ha sido evidente por varios experimentos. Georgopoulos (17) obtuvo mutantes bacterianas en el gen que codifica para la subunidad beta de la RNAPol dentro del genoma de E. coli (región rif). La polimerasa de estas cepas presenta cambios en sus propiedades bioquímicas con respecto a la polimerasa de las cepas silvestres. Estas mutantes inhiben el crecimiento del bacteriófago  $\lambda$ . Por otra parte Pironio y Ghysen (18) aislaron mutantes en esta misma subunidad, a las que nombraron ron, estas mutantes tienen la característica de inhibir el crecimiento de bacteriófagos lambdoides que presentan una alteración en el gen N (mutantes mar), (TABLA 1, Figura 2).

Nakamura (45) obtuvo mutantes bacterianas en la subunidad sigma de la RNA polimerasa que impiden el crecimiento de bacteriófagos dependientes de N para un desarrollo, permitiendo en cambio el crecimiento de fagos independientes de N. Asimismo, la mutación bacteriana nusC, que también inhibe el desarrollo del bacteriófago  $\lambda$ , se ha localizado en la RNAPol encontrándose que en ensayos "in vitro" la enzima es inactiva en algunas pruebas (24).

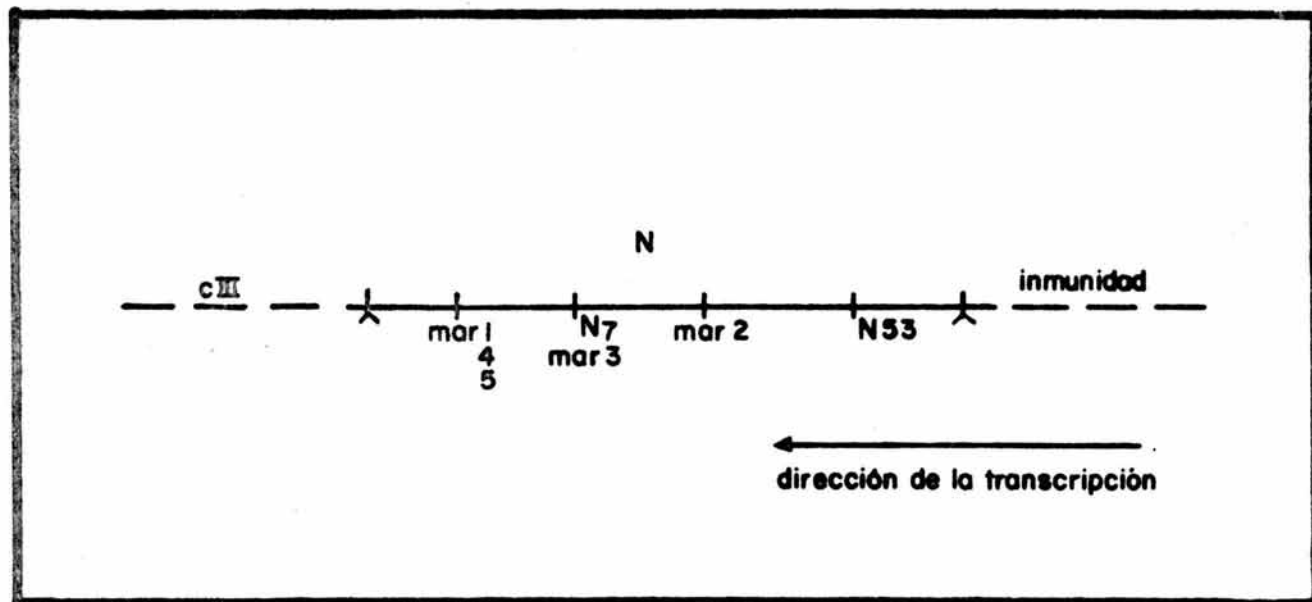
La evidencia bioquímica que apoya la interacción RNAPol-pN fue aportada por Pearson y colaboradores (9). Los autores coinmunoprecipitaron a la RNAPol y a pN, cuando añadieron anticuerpos contra la polimerasa a un extracto de células infectadas con el bacteriófago lambda. Por último y de acuerdo con

TABLA 1. Origen de las mutaciones mar. Pironio y Ghysen (18) aislaron 5 diferentes bacteriófagos lambdoides con una mutación en pN, a la que denominaron mar. Estos bacteriófagos mutantes son incapaces de desarrollarse en cepas bacterianas ron<sup>-</sup> (mutación en la subunidad  $\beta$  de la RNAPol). En la Tabla se muestran las líneas de los bacteriófagos a partir de las cuales se aislaron los mutantes mar.

TABLA 1

Mutaciones <u>mar</u>	bacteriófagos
<u>mar 1</u>	434, todos los $\lambda$ <u>imm434</u> excepto $\lambda$ <u>imm434</u> , <u>N213</u> y derivados <u>int</u> y <u>red</u>
<u>mar2</u>	$\lambda$ <u>P207</u>
<u>mar3</u>	$\lambda$ <u>N7</u>
<u>mar4</u>	$\lambda$ <u>bio256</u>
<u>mar5</u>	$\lambda$ <u>cII3031</u>

FIGURA 2. Localización genética de las mutantes mar. Ghysen y Pironio (18) aislaron 5 diferentes mutaciones mar, que mapean en el gen N del bacteriófago  $\lambda$ . En la Figura se muestra la localización genética de las mutaciones mar. Asimismo, se señala la ubicación de las mutaciones ambar N7 y N53. La flecha indica la dirección de la transcripción del gen N del bacteriófago lambda.



lo anterior Goday y Greenblatt (25) encontraron que en un sistema "in vitro" al que añadieron pN pura, la RNA polimerasa aumentaba hasta 10 veces su actividad con respecto a un control, sugiriendo que pN modifica estequiométricamente a la polimerasa.

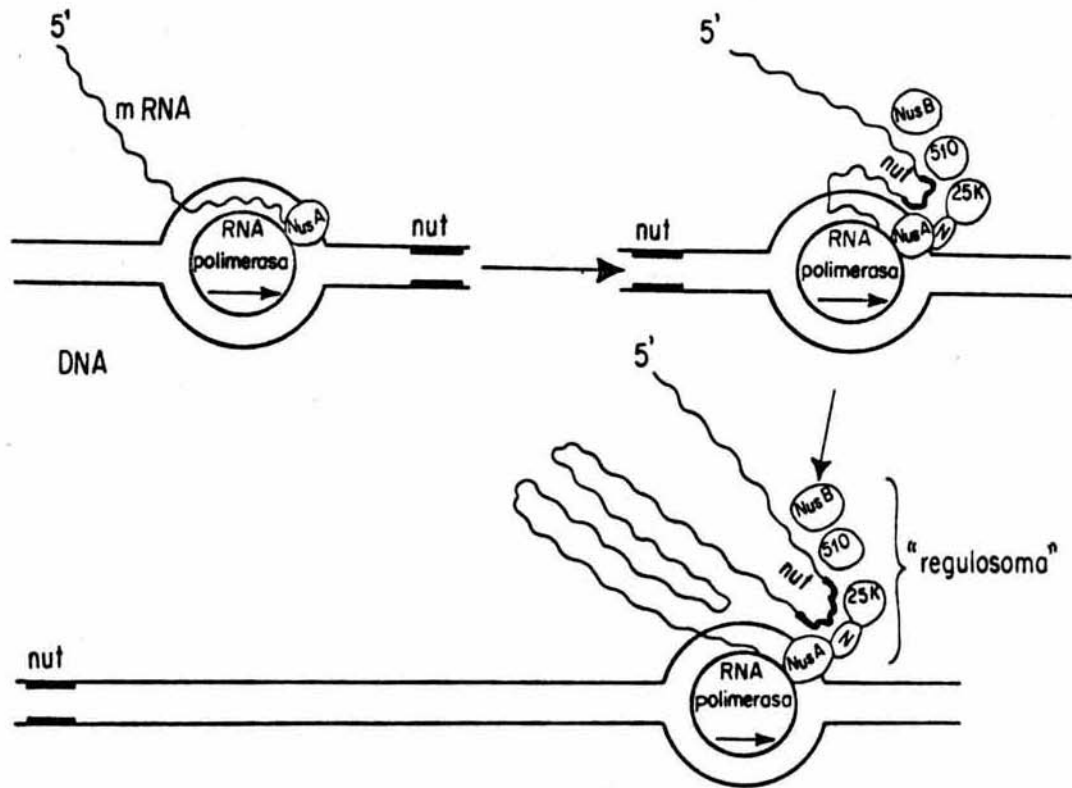
Considerando los resultados anteriores, es probable que durante el proceso de antiterminación de la transcripción, pN modifique a la RNA polimerasa, mediante la interacción que mantiene con ella a nivel de las subunidades beta y sigma.

El fenómeno de la antiterminación de la transcripción es bastante complejo, son muchos los factores que están involucrados para su funcionamiento. Greenblatt propuso un modelo para la antiterminación de la transcripción mediada por pN (24). En este modelo el autor considera a todas las proteínas implicadas en el proceso dentro del calificativo de "regulosoma". La aportación novedosa de este modelo consiste en considerar que el sitio nut funciona a nivel de RNA, siendo su actividad la de estabilizar al complejo de antiterminación formado entre la RNA pol y el "regulosoma" (Figura 3).

Aunque no existe una prueba directa de que el sitio nut actúa a nivel de RNA, hay varias evidencias indirectas que lo sugieren. Se ha observado que cuando la transcripción a partir de pR es bloqueada por la presencia de ribosomas, se inhibe la acción de pN (24).



FIGURA 3. Modelo para antiterminación de la transcripción del bacteriófago  $\lambda$ . La antiterminación de la transcripción es un fenómeno regulatorio de gran importancia en el desarrollo del bacteriófago lambda. La proteína N del bacteriófago  $\lambda$  juega un papel esencial durante este proceso, aunque no se sabe con exactitud como ejerce su actividad antiterminadora. Greenblatt (24) propuso recientemente un modelo para la antiterminación de la transcripción que se muestra en la Figura. Este autor sugiere que el sitio "nut" (necesario para la acción de N ) funcionalmente se encuentra como RNA, siendo su papel el de estabilizar el complejo de antiterminación, formado por la proteína N, RNAPol-NusA y todos los demás factores implicados en el proceso a los que el denomina en conjunto como "regulosoma".



El control ejercido por la antiterminación de la transcripción no es un mecanismo particular del bacteriófago lambda. Se ha visto que los bacteriófagos  $\phi$ 21 y P22, a pesar de tener una secuencia de DNA diferente a la que presenta el bacteriófago lambda, mantienen una homología con éste, en cuanto a sitios del DNA relacionado con las funciones de pN, como son las secuencias nut y boxA (secuencia necesaria para el funcionamiento de NusA), lo que indica que estos bacteriófagos pueden llevar a cabo también la antiterminación de la transcripción. En la bacteria E.coli también se ha reportado este tipo de control transcripcional. Li y colaboradores (40) encontraron un sistema de antiterminación implicado en la síntesis del RNA ribosomal bacteriano. Estos autores reportan un fragmento de restricción de 67 pb situado en la región denominada rrnG como responsable de la disminución en la terminación de la transcripción del operon bacteriano para el RNA ribosomal. Por otra parte Holben y colaboradores (44) reportan que en este mismo operon bacteriano, el promotor y la secuencia líder de la región llamada rrnC, promueven independientemente la antiterminación de la transcripción en sitios de terminación dependientes de Rho.

Considerando las evidencias anteriores, es probable que el fenómeno de antiterminación de la transcripción se encuen-

tre (contrariamente a lo que se pensaba) distribuido más ampliamente en los sistemas biológicos, lo que realza la importancia de su estudio en el bacteriófago lambda, donde se encuentra más caracterizada.

Siendo pN el elemento central durante el proceso de la antiterminación de la transcripción, un análisis más directo de esta proteína es importante para elucidar el mecanismo exacto de su acción. Sin embargo, su estudio directo se ha dificultado debido entre otras cosas a 2 características de esta proteína; su pequeño peso molecular y su inestabilidad.

En un análisis electrofóretico, esta proteína normalmente es enmascarada por otros péptidos del bacteriófago que son de tamaño similar y que dependen de pN para su síntesis. Pearson y colaboradores (9) lograron superar esta dificultad utilizando un sistema en donde pN estaba presente pero carecía de funcionalidad (utilizaron una cepa ron<sup>-</sup>, infectada con un bacteriófago lambda mar). Utilizando este sistema los autores fueron capaces de evitar la síntesis de péptidos dependientes de pN; y lograron determinar el peso molecular de la proteína N (13.5 Kd). Greenblatt (28) logró purificar a la proteína N mediante métodos cromatográficos, la reportó como un monómero de aproximadamente 107 aminoácidos, rica en lisina, arginina, prolina y con una sola metionina en el extremo NH<sub>2</sub>, con un peso molecular de 12-12500 daltones. Este mismo autor en un reporte posterior (24) reportó a pN con un peso molecular

de 14 Kd, coincidiendo con el reporte de Ishil y colaboradores (34).

Estas diferencias en cuanto al peso molecular de pN pueden deberse a diferentes formas de la proteína producidas por degradación o a variación en cuanto a el inicio o el final de su transcripción. A este respecto Lozaron (3) encontró que existen 2 codones de iniciación en fase para pN, en las posiciones 145 y 223 con respecto a pL; lo que podría explicar los diferentes tamaños de pN. No obstante este mismo autor menciona que el primer codon de iniciación para pN se pierde debido a un procesamiento que sufre el RNAm por acción de la RNAasa III bacteriana, que de esta forma se cree que regula la síntesis de esta proteína.

Con la utilización del 2º codon de iniciación se produciría una proteína de aproximadamente 107 aminoácidos que corresponden a un peso molecular de 11.800 Kd. Sin embargo se sabe que proteínas básicas como pN cuando son analizadas electroforéticamente, migran más lento que su tamaño en un campo eléctrico, lo que explicaría las formas de mayor peso molecular encontradas.

Como se mencionó anteriormente, la inestabilidad de pN dificulta su estudio, esta proteína tiene una vida media de dos minutos a 35°C (22). No obstante su vida media aumenta en

extracto crudo de células infectadas con  $\lambda$ , a una temperatura de 0°C (26).

Gottesman (20) encontró que en cepas bacterianas  $\text{lon}^-$  infectadas con el bacteriófago  $\lambda$ , la vida media de pN, medida como su desaparición en geles de poliacrilamida y por ensayos de superinfección aumentada de 3-5 veces con respecto a la cepa  $\text{lon}^+$  (Fig. 4). El producto del gen  $\text{lon}$  es una proteasa dependiente de ATP para su actividad, que degrada proteínas tanto silvestres como formas mutantes, lo que indica que la inestabilidad que presenta pN es debida al ataque proteolítico de pLon.

Varios autores han sugerido que la formación de complejo pN-RNA polimerasa podría estar influyendo en la estabilidad de pN y que esta estabilidad juega un papel muy importante durante el proceso de la antiterminación de la transcripción (20, 9, 53).

A este respecto, Vaca y Sosa (comunicación personal) analizaron el desarrollo de bacteriófagos  $\text{mar}$  en mutantes bacterianas  $\text{ron}$  que carecían de la actividad  $\text{lon}^-$ , encontrando los resultados que se muestran en la TABLA 2. En una cepa bacteriana  $\text{ron lon}$ , obtuvieron crecimiento del bacteriófago  $\text{N mar3}$ , a diferencia de lo reportado por Pironio, de que esta mutante  $\text{mar}$  no se desarrolla en una cepa  $\text{ron}^-$ . Basados en estos datos, propusieron que la formación del complejo

FIGURA 4. Estabilidad de la proteína N del bacteriófago  $\lambda$  en cepas bacterianas  $lon^+$  y  $lon^-$ . Gottesman y colaboradores (20) reportaron que la vida media de pN aumenta hasta 5 veces en una cepa  $lon^-$ , con respecto a la cepa silvestre. Estos autores midieron la vida media de pN mediante un ensayo de superinfección, utilizando cepas lisógenas que llevaban un profago incompleto ( $\lambda$  BAM N,  $cI857$  HI). A cultivos de estas bacterias crecidas a  $37^\circ\text{C}$  les aplicaron un pulso de 10 minutos a  $42^\circ\text{C}$ , para inactivar el represor termosensible  $cI857$  e inducir la producción de pN durante este lapso de tiempo. Posteriormente retornaron los cultivos a  $32^\circ\text{C}$  para que cesara la síntesis de pN. A los diferentes tiempos indicados en la gráfica tomaron alícuotas de sus cultivos y los infectaron con el bacteriófago heteroinmune  $\lambda_{imm434N^-}$  que requiere a pN para desarrollarse. De esta forma la producción de u.f.p. de este bacteriófago les dió un índice de la actividad de pN. La vida media de pN en la cepa  $lon^+$  fue de 1-2 minutos y de 10 minutos en la cepa  $lon^-$

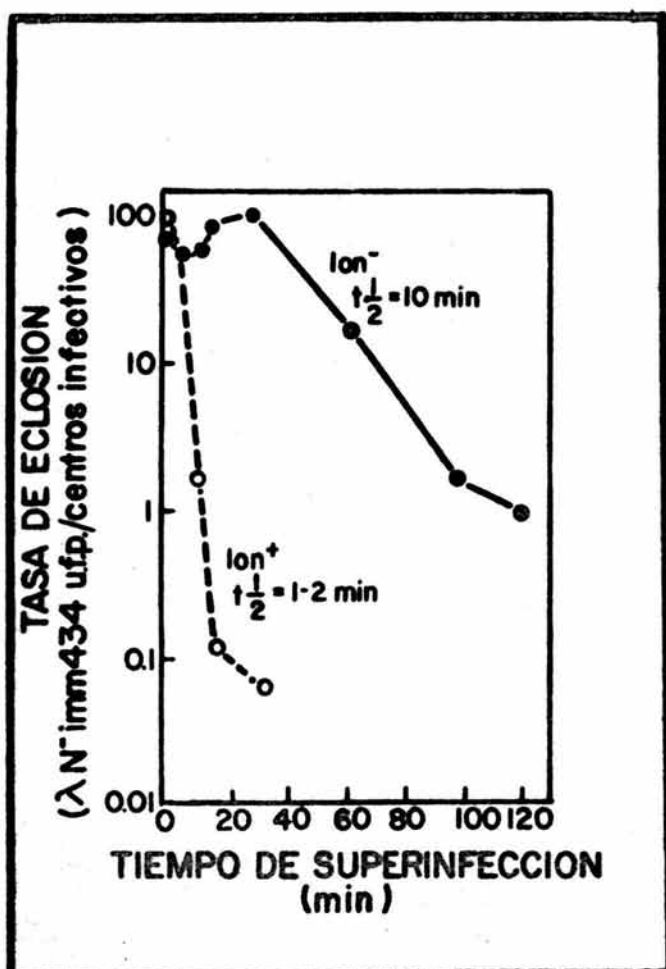




TABLA 2. Supresión del fenotipo Mar por la mutación lon.  
Vaca, S. y Sosa, L. (comunicación personal) obtuvieron que en una cepa doble mutante ron lon el fenotipo Mar del bacteriófago  $\lambda N7_{\text{mar}3}$  es suprimido. Infectaron a sus cepas bacterianas con los diferentes bacteriófagos y plaquearon en cajas de 7Ø suave. La temperatura de incubación fue de 42°C.

(+) crecimiento de bacteriófagos

(-) ausencia de crecimiento

TABLA 2

Cepas bacterianas	Bacteriófagos		
	$\lambda$ <sup>+</sup>	$\lambda$ N7 <u>mar3</u>	$\lambda$ Ots
<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>supE</u>	+	+	+
<u>ron</u> <sup>-</sup> <u>supE</u>	+	-	-
<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	+	-	+
<u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>supE</u>	+	+	+

RNA polimerasa-pN protegía a pN de la degradación por parte de pLon; por esta razón cuando la polimerasa se encuentra alterada (cepa ron<sup>-</sup>) el complejo interacciona débilmente y el ataque proteolítico sobre pN es más fuerte, afectándose así el crecimiento del bacteriófago  $\lambda$  mar. De igual forma en una cepa ron<sup>-</sup> lon<sup>-</sup> el complejo a pesar de estar alterado logra interaccionar permitiendo el desarrollo del bacteriófago, sugiriendo que en condiciones lon<sup>-</sup> el aumento en la vida media de pN ayuda a mejorar la eficiencia en la antiterminación de la transcripción. Sin embargo, en estos resultados no se utilizaron cepas bacterianas isogénicas.

Retomando la propuesta hecha por varios autores, en cuanto a la importancia de la estabilidad de pN en el proceso de antiterminación de la transcripción y apoyándose en los resultados de Sosa y Vaca el objetivo del presente trabajo fue el estudio del papel que juega la estabilidad de pN en la formación de un complejo RNAPol-pN activo en antiterminación de la transcripción. Para cumplir con este objetivo, se analizó el proceso de antiterminación de la transcripción, en un sistema donde la vida media de pN es alta y el complejo formado por la RNAPol y pN presenta alteraciones en uno o en ambos de sus componentes. Este sistema se obtuvo mediante la construcción de cepas isogénicas; ron<sup>+</sup> lon<sup>+</sup>, ron<sup>+</sup> lon<sup>-</sup>, ron<sup>-</sup> lon<sup>+</sup>, ron<sup>-</sup> lon<sup>-</sup> y el uso de bacteriófagos lambdoides con alteraciones en la proteína N (Nmar, N7 y N53).

## MATERIAL Y METODOS

1) Cepas bacterianas. Las cepas bacterianas que se utilizarón en el presente trabajo se enlistan en la Tabla 3.

2) Bacteriófagos. Los bacteriófagos utilizados en este trabajo, se enlistan en la Tabla 4.

3) Medios de cultivo y soluciones. Los medios de cultivo que se utilizarón en este trabajo se describen a continuación medio LB (10 g Triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, aforado a un litro con agua destilada para la preparación del medio líquido. Para la preparación de cajas se añadieron 15 g de agar. En la preparación de cajas de LB, con antibiótico, éste se añadió al medio después de ser esterilizado, utilizando; 12.5µg/ml de Tetraciclina (tc) y cloramfenicol (cm) en 1 litro; 5 µg/ml, 8.3 µg/ml y 10 µg/ml de nitrofurantoina en 1 litro); medio Tø (10 g bactotripton, 2.5 g NaCl, 2 ml de NaOH al 2%, 10 g de agar por litro), medio Tø suave (10 g tripton, 2.5 g NaCl, 2 ml de NaOH al 2%, y 6 g de agar por litro); medio R (10 g bactotripton, 1 g bacto-extracto de levadura, 8 g NaCl, por litro, después de esterilizarse se le agregó 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 M y 5 ml de glucosa al 20% ambos esterilizados por filtración. Para la preparación de cajas se adicionaron 12 g de agar), medio R suave (al medio R se le añadió 8 g de agar Difco); medio Mac Conkey lactosa (40g de agar base Mac Conkey en 1 litro de agua destilada, después de esterilizarse el medio se adicionó lactosa al 1% previamente

te esterilizada por filtración), medio mínimo (13.6 g  $K_2HPO_4$ , 2 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.2 g  $MgSO_4$ , 0.5 mg  $FeSO_4$ , 2 g glicerol en 500 ml, ajustando el pH a 7. Para la preparación de cajas se adicionaron 6 g de agar. Este medio se suplementó con vitamina B1 al 1%, L-histidina al 2%, L-arginina al 2%, DL-metionina al 1%, DL-isoleucina-valina al 1%, DL-fenilalanina al 1%, L-leucina al 0.5%, DL-serina al 2%, L-treonina al 0.5%, L-glicina al 2%, L-asparagina al 0.5%, L-triptofano al 0.25%; previamente esterilizados por filtración); cajas de agarosa (se disolvió por calentamiento agarosa al 1%, en agua destilada, se permitió su enfriamiento a 45°C y se añadió Bromuro de etidio a una concentración de 0.5 mg/ml, la mezcla fue vaciada en cajas de Petri y éstas se guardaron en la oscuridad); solución SM (5.8 g NaCl, 0.5 g gelatina, 48.5 ml de agua, se ajusta el pH a 7.4, y después de esterilizar se agregó 45 ml de Tris 1 M pH 7 y 2.5 ml de  $MgSO_4$  1M); solución de citrato de sodio ( $10^{-2}$  M de citrato de sodio pH 8.5, en agua destilada); regulador de fosfatos (61 ml de  $Na_2HPO_4$  y 39 ml de  $NaH_2PO_4$ ); solución MC (1 ml de  $MgSO_4$  1 M, 0.05 ml de  $CaCl_2$  1 M y 8.95 de agua destilada); solución I (Tris HCl 25 mM pH 7.5, glucosa 50 mM y EDTA 10 mM pH 8 en agua bidestilada estéril); solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1%, en agua bidestilada estéril); solución III (acetato de sodio 3 M en agua bidestilada estéril); solución Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM en agua bidestilada estéril).

#### 4) Métodos.

##### Propagación de bacteriófagos por infección em medio líquido.

Se colocaron en un matráz 10 ml de medio LB, 0.5 ml de un cultivo fresco de la bacteria C600 y 100 ml de  $\text{CaCl}_2$  1 M; se adicionó una placa lítica del bacteriófago por propagar, dicha placa fue extraída del agar utilizando una pipeta Pasteur. La mezcla obtenida se incubó con agitación a 37°C, durante un período de 3 a 5 horas hasta observar lisis bacteriana. Una vez ocurrida la lisis se añadieron 6 gotas de cloroformo agitando suavemente el matráz, y esto se dejó reposar 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10Krpm decantándose el sobrenadante que corresponde a la suspensión de bacteriófagos y desechándose la pastilla. Las preparaciones de bacteriófagos fueron tituladas y almacenadas a 4°C.

Titulación de lisados fágicos. Para llevar a cabo la titulación de las partículas fágicas, se diluyeron los lisados (1:10, 1:100, 1:1000 veces). Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución y se infectaron 100  $\mu\text{l}$  de un cultivo fresco de bacteria C600; se permitió la adsorción durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 2.5 ml de T $\phi$  suave a 45°C, previamente fundido, y las mezclas se vertieron en cajas de T $\phi$ . Las cajas se incubaron durante toda la noche a 37°C, se cuantificaron las placas obtenidas y los títulos se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro (u.f.p/ml). Los lisados se almacenaron a 4°C.

Crecimiento mucoide de las cepas lon<sup>-</sup>. Las mutantes lon<sup>-</sup> presentan apariencia mucoide cuando son crecidas en medio mínimo (32). Para caracterizar a las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo, se crecieron las bacterias en medio LB durante una noche a 37°C; a partir de estos cultivos se efectuó la siembra por estria en cajas de medio mínimo. Estas cajas se incubaron por una noche a 37°C, y al día siguiente se observó la morfología colonial.

Sensibilidad bacteriana a antibióticos. Las bacterias por analizar, se crecieron en medio LB durante una noche a 37°C, de estos cultivos se tomó un inóculo para sembrar por estrias en cajas de medio; LB-tc, LB-cm y LB-nitrofurantofina. Las cajas se incubaron por una noche a 37°C, excepto para las cajas de L-cm que se incubaron a 32°C. Al día siguiente se evaluó el crecimiento bacteriano.

Inducción de la filamentación. Las cepas lon<sup>-</sup> sufren filamentación cuando son sometidas a irradiación con luz ultravioleta (2). La técnica que se utilizó fue esencialmente la reportada por estos autores; las bacterias fueron crecidas en medio LB hasta una densidad óptica de 0.4 (D.O), a 560 nm, las células se centrifugaron a 10Krpm y el paquete bacteriano fue resuspendido en regulador de fosfatos y colocado en cajas de Petri. Estas células fueron irradiadas con luz ultravioleta (UV), a una distancia de 50 cm en agitación constante y durante diferentes tiempos. 500 µl de los cultivos irradia-

dos se utilizaron para inocular 3 ml de LB, estos tubos se incubaron con agitación durante 3 horas a 37°C. Al finalizar este tiempo se prepararon frotis de las bacterias para su observación al microscopio óptico (M.O.), utilizando contraste de fases.

Transducción generalizada mediada por el bacteriófago P1 cm. La técnica utilizada es la reportada por Miller (43).

i) Obtención de lisógenas. Las bacterias donadoras se crecieron en medio LB, adicionado de  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de 5 mM. Se permitió el crecimiento de estas células hasta fase exponencial ( $D_{0.4} = 0.4$  a 560 nm), se centrifugaron durante 10 minutos a 10Krpm y se resuspendieron en 1 ml del mismo medio. Posteriormente se infectaron estas células con el bacteriófago P1 cm a una multiplicidad de infección (moi) de 0.1. Se incubaron las muestras durante 20 minutos a 32°C, y se espatularon diferentes diluciones de la mezcla de infección en cajas de medio LB y LB-cm. Las cajas fueron incubadas a 32°C durante 1 noche y se seleccionaron las bacterias resistentes a cloramfenicol.

ii) Obtención de los lisados. Las bacterias lisógenas se crecieron a 32°C en un matrás que contenía 10 ml de medio LB y  $\text{MgSO}_4$  a una concentración final de  $10^{-2}$  M, se permitió el crecimiento hasta alcanzar la fase logarítmica. Posteriormente, se incubaron los cultivos a 40°C durante 35 minutos



y a 37°C hasta que se observó la lisis celular. Se añadieron 6 gotas de cloroformo a cada uno de los matraces y éstos se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos a 10Krpm y se guardó el sobrenadante desechándose la pastilla. Los lisados se titularon en la bacteria C600 y se almacenaron a 4°C.

iii) Transducción. Las bacterias receptoras se crecieron en medio LB a 37°C durante una noche, se centrifugaron por 10 minutos a 10Krpm resuspendiéndose la pastilla en regulador M. C. Las células se incubaron durante 15 minutos a 37°C y se tomaron 100 µl de cada cultivo para ser infectado con 100 µl de las diferentes diluciones ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) de los lisados del bacteriófago P1 cm. Las mezclas de infección se incubaron a 37°C durante 20 minutos, y posteriormente se les añadieron 200 µl de una solución de citrato de sodio 1 M; finalmente se espatularon en cajas de medio selectivo, a 37°C durante 24 horas, para aislar las bacterias transductantes.

Selección de cepas pro $\phi$ <sup>-</sup>. Las bacterias por analizar se crecieron a 37°C durante una noche, a partir de estos cultivos se sembró un inóculo en cajas de medio mínimo con y sin prolina. Las cajas fueron incubadas durante 1 noche a 37°C, y posteriormente se evaluó el crecimiento bacteriano.

Extracción de DNA de plásmido. Se creció la bacteria portadora del plásmido pMY228, hasta alcanzar la fase exponencial a 37°C, el cultivo se centrifugó por 10 minutos a 10Krpm, resuspendiéndose las pastilla en 200  $\mu$ l de la solución I, se agregaron 200  $\mu$ l de lisosima y la preparación se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, a continuación se añadieron 400  $\mu$ l de solución II y después de 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 300  $\mu$ l de la solución III. La mezcla se colocó durante 5 minutos en hielo seco-etanol, se centrifugó en frío durante 10 minutos a 10Krpm, y al sobrenadante se le añadieron 2 volúmenes de etanol. La preparación se colocó de 30 a 60 minutos en hielo seco-etanol y se centrifugó en frío a 10Krpm. La pastilla se resuspendió en 500  $\mu$ l de Tris-EDTA, pH 7.5 y se añadió RNAasa a una concentración final de 25 mM. Posteriormente la solución fue extraída con un volumen de fenol saturado (con Tris 10 mM, pH 8), se centrifugó en frío durante 3 minutos a 10Krpm, se añadió 1 volumen de cloroformo al sobrenadante, previa agitación, los tubos fueron centrifugados en frío durante 3 minutos a 10Krpm. Se tomó la fase acuosa y se precipitó con la solución III a una concentración final de 0.3 M en hielo seco-etanol. Se centrifugó en frío durante 15 minutos a 10Krpm y se lavó la pastilla con etanol al 70%; finalmente la pastilla se secó al vacío y se resuspendió en 100  $\mu$ l de Tris-EDTA, pH 7.5.

Cuantificación de DNA. En cajas de agarosa al 1% con Bromuro

de etidio al  $0.5 \mu\text{g/ml}$  (42), se colocaron alícuotas de  $2 \mu\text{l}$  de diferentes diluciones de la suspensión de DNA por cuantificar. Después, de 30 minutos a 1 hora de incubación de las cajas en la obscuridad; se observó la fluorescencia de las muestras en un transiluminador de luz ultravioleta. La Fluorescencia de las muestras por cuantificar se comparó con la de un DNA control (DNA de timo de ternera).

Transformación de E. coli. Como primer paso se obtuvieron las células competentes de las cepas que se deseaban transformar; para esto se crecieron las bacterias a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una noche en medio LB, se tomaron  $0.1 \text{ ml}$  de estos cultivos para inocular  $10 \text{ ml}$  de medio LB, que se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , hasta llegar a una densidad óptica de  $0.4$  a  $560 \text{ nm}$  (aproximadamente  $5 \times 10^7 \text{ cel./ml}$ ). Estos cultivos se centrifugaron en frío durante 10 minutos a  $10\text{Krpm}$ , la pastilla se resuspendió en  $\text{CaCl}_2$   $100 \text{ mM}$ , en la mitad del volumen inicial, la mezcla se dejó reposar en hielo durante 10 minutos y se centrifugó en frío durante 10 minutos a  $10\text{Krpm}$ . La pastilla se resuspendió en  $\text{CaCl}_2$   $100 \text{ mM}$  en  $1/10$  del volumen inicial y se dejó reposar en hielo durante una noche ( $6$  a  $4^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente se tomaron  $100 \mu\text{l}$  de cada bacteria mezclándose y homogenizándose con  $100 \mu\text{l}$  de Tris  $50 \text{ mM}$   $\text{pH } 8$  y  $1 \mu\text{l}$  de DNA del plásmido PMY228. Esta mezcla se dejó en hielo durante 30 minutos, se sometió a un choque térmico por incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos y posteriormente se añadió  $1 \text{ ml}$  de medio LB calentado a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  incubándose durante media hora

a 37°C sin agitar. Finalmente, diferentes diluciones de la preparación resultante se espatularon en cajas de LB y LB-tc, incubándose éstas a 37°C durante 24 horas para observar las transformantes.

TABLA 3  
CEPAS BACTERIANAS

Nombre	Genotipo Relevante	Origen o Recurso
54	<u>supF</u> ( $\lambda$ imm434)	C.I.E.A.
26	<u>supF</u> ( $\lambda$ )	C.I.E.A.
509	<u>lacZ</u> ::tn10 <u>proC</u> <sup>-</sup>	C.I.E.A.
C600	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>supE</u>	Appleyard, 1954
358	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>pro</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> am	Pearson, M.
359	<u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>pro</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> am	Pearson, M.
SG20	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> ::tn10	Gottesman, S.
347	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>+</sup>	C.I.E.A.
377	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>proC</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>-</sup>	Gottesman, S.
100	<u>supF</u> ;;tn10	C.I.E.A.
CSH26	<u>pro</u> <u>lac</u> <u>ara</u> (pMY228)	Raftery, 1984

TABLA 3, (Continuación)

NOMBRE	GENOTIPO RELEVANTE	ORIGEN O RECURSO
N5340	<u>ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup> uvrB</u>	Gottesman, 1981
SG13504	<u>ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup> uvrB</u>	Gottesman, 1981
BCV4	<u>ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup>::tnl0 lacam</u>	Este trabajo
BCV20	<u>ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup> lacZ::tnl0 proC<sup>-</sup></u>	Este trabajo
BCV1	<u>ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> proC<sup>+</sup> lacam</u>	Este trabajo
BCV18	<u>ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> proC<sup>+</sup> lacam</u>	Este trabajo
BCV21	<u>ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> proC<sup>+</sup> lacam</u>	Este trabajo
BCV01	<u>ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup> lacam supF::tnl0</u>	Este trabajo
BCV11	<u>ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup> lacam supU::tnl0</u>	Este trabajo
BCV02	<u>ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup> lacam supF::tnl0</u>	Este trabajo
BCV22	<u>ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup> lacam supU::tnl0</u>	Este trabajo
BCV03	<u>ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> proC<sup>+</sup> lac<sup>-</sup> supF::tnl0</u>	Este trabajo
BCV33	<u>ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> proC<sup>+</sup> lac<sup>-</sup> supU::tnl0</u>	Este trabajo

TABLA 4

## Bacteriófagos y Plásmidos

Nombre	Características	Origen o Recurso
$\lambda_{cI857}$	Represor termosensible de lambda	Sussman y Jacob, 1962
$\lambda_{imm434}$	Híbrido que contiene la región de inmunidad del fago lambdaoide 434	Kaiser y Jacob, 1957
$\lambda_{imm434cI^-}$	Híbrido que contiene la región de inmunidad del fago lambdaoide 434, presenta una mutación en el represor	C.I.E.A.
$\lambda_{bio256}$	Sustitución del perón <u>bio</u> que elimina los genes comprendidos entre P.P' y cIII, incluso un fragmento del gen N	C.I.E.A.
$\lambda N7$	Mutación ambar en el gen N suprimible por <u>supE</u> , F y U	Campbell, 1961
$\lambda N53$	Mutación ambar en el gen N suprimible por <u>supE</u> , F y U	Campbell, 1961
$\lambda N753$	Mutaciones ambar en el gen N suprimible por <u>supE</u> , F y U	Campbell, 1961
$\lambda 029$	Mutación ambar en el gen 0, suprimible por <u>supE</u> , F y U	C.I.E.A.
$\lambda_{imm434r32}$	Híbrido que contiene la región de inmunidad del fago 434 y una inserción IS2 que adiciona un terminador independiente de Rho antes de los genes O y P	Brachet, 1970
P1 cm	Porta resistencia a cloramfenicol	Rosner, 1972
pMY228	Contiene al <u>supV</u> junto a la región de resistencia a tetraciclina	Raftery, 1984

## RESULTADOS

En este trabajo se llevó a cabo un estudio del papel que juega la estabilidad de pN en la antiterminación de la transcripción promovían por complejos RNA polimerasa-pN modificados en uno o en ambos de sus componentes. La estabilidad de pN, se varió mediante el uso de cepas bacterianas lon<sup>+</sup> y lon<sup>-</sup>, y la formación del complejo de antiterminación RNA pol-pN se modificó utilizando mutaciones en la polimerasa (cepa ron<sup>-</sup>) y en pN (bacteriófago N ambar y N mar). El primer paso que seguimos en nuestra estrategia fue el de la identificación de bacteriófagos mutantes mar.

I. Identificación de bacteriófagos con fenotipo Mar. Ghysen y Pironio (18) reportaron la existencia de 5 bacteriófagos lambdoides con una mutación en la proteína N, denominada mar. Este tipo de bacteriófagos son incapaces de crecer en bacteria que presentan una mutación en la subunidad beta de la RNA polimerasa denominada ron (18). Para que se observe la exclusión de estos bacteriófagos es necesario que se presenten ambas mutaciones, un bacteriófago mutante mar si presenta crecimiento en una bacteria ron<sup>+</sup> así como una bacteria ron<sup>-</sup> permite la propagación de bacteriófagos mar<sup>+</sup>.

Debido a nuestro interés por identificar bacteriófagos mutantes mar, infectamos a cepas bacterianas ron<sup>+</sup> y ron<sup>-</sup> con los bacteriófagos que se deseaban probar y seleccionamos aquellos que presentaron crecimiento en la cepa ron<sup>+</sup> pero no en la cepa ron<sup>-</sup> (fenotipo Mar) (Tabla 5). Se identificaron 2 bacte-



TABLA 5. Caracterización de bacteriófagos con fenotipo Mar.

Se probó el desarrollo de los bacteriófagos  $\lambda_{imm434}$ ,  $\lambda_{imm434cI}$ ,  $\lambda_{cI857}$  y  $\lambda_{bio256}$  sobre las bacterias,  $supF(imm\lambda)$ ,  $supF(imm434)$ ,  $ron^+sup^0$ ,  $ron^-sup^0$ ,  $lon^-sup^0$ , con el objeto de identificar a aquellos que tuvieran el fenotipo Mar. Se gotearon 10  $\mu$ l de varias diluciones de los bacteriófagos ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) sobre cajas de TØ que contenían un tapiz de cada una de las bacterias señaladas. Las cajas se incubaron durante una noche a 37° C.

+ crecimiento del bacteriófago.

- ausencia de crecimiento.

TABLA 5

BACTERIOFAGOS PROBADOS	CEPAS BACTERIANAS			
	<u>supF</u> ( <u>imm</u> $\lambda$ )	<u>supF</u> ( <u>imm</u> 434)	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	<u>ron</u> <sup>-</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>
$\lambda$ <u>imm</u> 434	+	-	+	-
$\lambda$ <u>imm</u> 434cI	+	-	+	+
$\lambda$ <u>bio</u> 256	-	+	+	-
$\lambda$ <u>cI</u> 857	-	+	+	+

riófagos con fenotipo Mar, el bacteriófago  $\lambda$ bio256 y el  $\lambda$ imm434, descritos anteriormente por Ghysen y Pironio. Estos autores reportan que todos los bacteriófagos  $\lambda$ imm434 poseen el fenotipo Mar, sin embargo, nosotros encontramos que el fago  $\lambda$ imm434c1<sup>-</sup> es capaz de crecer en una cepa bacteriana ron<sup>-</sup>.

Se contaba también con el bacteriófago  $\lambda$ N7 reportado por Ghysen y Pironio como mar<sup>-</sup>; sin embargo para probar su fenotipo Mar se requería de una cepa ron<sup>-</sup> con supresor de mutaciones ambar. Posteriormente se detalla la construcción de esta cepa, así como la caracterización del bacteriófago  $\lambda$ N7.

II. Caracterización de cepas bacterianas lon<sup>-</sup>. Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos de este trabajo fue analizar el efecto de un aumento en la estabilidad de N sobre la antiterminación de la transcripción, esto se llevó a cabo utilizando cepas bacterianas lon<sup>+</sup> y lon<sup>-</sup>. La caracterización de las mutantes lon fue el siguiente paso en este trabajo, utilizando una serie de pruebas que permitieron identificar inequívocamente a una mutante lon. Estas pruebas fueron utilizadas para caracterizar a las cepas lon<sup>-</sup> que se utilizaron como donadores de este carácter en la construcción de las cepas ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup> y ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> y posteriormente se probó la presencia de esta mutación en las cepas bacterianas construidas. Las cepas bacterianas lon<sup>-</sup> que se caracterizaron inicialmente fueron: SG20 (ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup>::tn10), SG13504 (ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup>uvrB), 377 (ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup>proC<sup>+</sup>) y la cepa 347 (ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup>gal<sup>+</sup>). En la caracterización se consideraron: la morfología colonial,

su sensibilidad a nitrofurantoina y su fenotipo filamentosos.

a) Morfología colonial de las cepas lon<sup>-</sup>. Las mutantes lon<sup>-</sup> fueron aisladas por Howard y colaboradores (32) debido a la apariencia mucoide que presentan las colonias bacterianas cuando son crecidas en medio mínimo. Esta morfología mucoide es el resultado de una sobreproducción de polisacáridos capsulares por la carencia de un mecanismo de represión para el operón gal y otras enzimas de la vía de síntesis de los polisacáridos (33).

En la Tabla 6 se muestra la morfología colonial de varias cepas bacterianas lon<sup>+</sup> y lon<sup>-</sup> tanto en medio LB como en medio mínimo. Las cepas lon<sup>+</sup> presentan morfología normal (no mucoide) en ambos medios de cultivo, mientras que las cepas lon<sup>-</sup> 347 y SG20 presentan una apariencia mucoide en medio mínimo. Las cepas 377 y SG13504 no presentan morfología mucoide en ninguno de los medios de cultivo a pesar de ser lon<sup>-</sup>. Este fenotipo se explica por la mutación gal<sup>-</sup> que presentan ambas cepas y que les impide sintetizar polisacáridos capsulares.

b) Inhibición del crecimiento de cepas lon<sup>-</sup> por nitrofurantoina. Otra de las primeras características que describieron en las mutantes lon<sup>-</sup> fue su sensibilidad a la luz ultravioleta y a agentes radiomiméticos. Estas cepas son incapaces de crecer en un medio de cultivo que contenga nitrofurantoina a diferencia de las cepas lon<sup>+</sup> que no se ven afectadas por este antibiótico (29).

TABLA 6. Morfología colonial de las cepas lon<sup>-</sup>. Cepas bacterianas que contienen la mutación lon forman colonias mucoides. Este fenotipo se observa solamente en bacterias gal<sup>+</sup>. A partir de cultivos bacterianos frescos se tomó un inóculo y se sembró por estria en cajas de medio LB y medio mínimo. Las cajas se incubaron por una noche a 37°C.

TABLA 6

CEPAS BACTERIANAS	MORFOLOGIA COLONIAL	
	Luria	Mínimo
(C600) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	normal	normal
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	normal	normal
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	normal	normal
(377) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>-</sup>	normal	normal
(SG20) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> ::tn10	normal	mucoide
(347) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>+</sup>	normal	mucoide
(SG13504) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>uvrB</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>-</sup>	normal	normal

En la Tabla 7 se muestra el crecimiento de las cepas bacterianas analizadas en presencia del antibiótico nitrofurantoina. Las bacterias se crecieron por estría en medio LB y medio LB-nitrofurantoina a varias concentraciones.

Las concentraciones de nitrofurantoina se seleccionaron de acuerdo a pruebas previas que se efectuaron, utilizando concentraciones del antibiótico cercanas a las reportadas por Grossman (29).

Los resultados de la Tabla 7 muestran que a las concentraciones de nitrofurantoina de 5 y 8.3  $\mu\text{g/ml}$  el crecimiento de las cepas lon<sup>-</sup> es totalmente inhibido mientras que las cepas lon<sup>+</sup> crecen en presencia de nitrofurantoina tanto como en el medio LB. A concentraciones altas de nitrofurantoina, como la de 10  $\mu\text{g/ml}$  tampoco las cepas lon<sup>+</sup> son capaces de crecer. Cabe mencionar que la cepa N5340 a pesar de ser lon<sup>+</sup> no presentó crecimiento a ninguna de las concentraciones del antibiótico debido a la mutación uvrB que le impide reparar el daño que causa la nitrofurantoina en su DNA.

c) Inducción de filamentación por radiación con luz ultravioleta. Como ya mencionamos anteriormente las cepas lon<sup>-</sup> son sensibles a la luz ultravioleta. Cuando estas células son irradiadas se activa la producción de la proteína Su1A cuya función es inhibir la división celular. En condiciones normales el producto del gen lon degrada a esta proteína permitiendo que ocurra una septación normal; sin embargo

TABLA 7. Inhibición del crecimiento de cepas lon<sup>-</sup> por nitrofurantoina. Las bacterias analizadas fueron crecidas en medio LB y medio LB en presencia de tres concentraciones de nitrofurantoina (5, 8.3 y 10 µg/ml). Este antibiótico inhibe el crecimiento de cepas lon<sup>-</sup> y uvr<sup>-</sup>. A partir de cultivos bacterianos frescos se tomó un inóculo y se sembró por estría en cajas de medio LB y LB-NIT. Las cajas se incubaron por una noche a 37°C. (+) crecimiento bacteriano (-) ausencia de crecimiento



TABLA 7

Cepas bacterianas	LURIA	LURIA NITROFURANTOINA		
		5 $\mu$ g/ml	8.3 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml
(C600) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	+	+	+	-
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> am	+	+	+	-
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> am	+	+	+	-
(377) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>-</sup>	+	-	-	-
(SG20) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> :: <u>tn10</u>	+	-	-	-
(SG13504) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>uvrB</u>	+	-	-	-
(NS5340) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>uvrB</u>	+	-	-	-
(347) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>+</sup>	+	-	-	-

en mutantes lon la actividad de la proteína SulA no está regulada, se presenta una inhibición de la división celular causando lo que se conoce como filamentación, aumento en la longitud de los bacilos de 50 a 100 veces (52). Esta propiedad de filamentación es la característica más importante asociada con la mutación lon, en base a ella se identifica inequivocadamente a estas bacterias. En este trabajo se montó la metodología que permitió observar este fenotipo en cepas lon<sup>-</sup>. Se tomaron cultivos bacterianos creciendo en fase exponencial y se resuspendieron en un regulador de fosfatos para irradiarlos con luz ultravioleta. Las bacterias irradiadas se cultivaron en medio rico por un período de 3 a 5 horas a 37°C. Finalmente se prepararon frotis para observarlos al microscopio óptico.

Los resultados obtenidos en la inducción de filamentación por radiación con luz U.V. se resumen en la Tabla 8. La morfología de las células antes de ser irradiadas (0 segundos) corresponde a la de bacilos tanto para las células lon<sup>+</sup> como para las lon<sup>-</sup> (Figuras 5 y 6 respectivamente). Al irradiar durante 10 segundos las bacterias lon<sup>+</sup> continuaron creciendo como bacilos (Figura 7) a diferencia de las lon<sup>-</sup> en las que se empezó a presentar la filamentación. En la mayoría de los campos analizados se encontraron filamentos aproximadamente 50 veces más grandes que los bacilos de bacterias normales (fotos no mostradas). A un tiempo de 25 segundos de irradiación las cepas lon<sup>+</sup> presentaron principios de filamentación pero al cabo de un tiempo se observaron de tamaño normal, (datos no mostrados). En relación a las mutantes lon<sup>-</sup>, en 3 de las 4

TABLA 8. Inducción de filamentación por radiación con luz ultravioleta. Bacterias lon<sup>-</sup> fueron irradiadas con luz ultravioleta por inducir su filamentación. 0 segundos significa no irradiación. Las bacterias se crecieron en medio LB líquido con agitación hasta fase logarítmica. Posteriormente se resuspendieron en una solución de fosfatos, y se irradiaron con luz ultravioleta durante los tiempos indicados. Las bacterias sobrevivientes se crecieron en medio LB líquido con agitación durante un período de 3 a 5 horas a 37°C. Al finalizar este tiempo se hicieron frotis para observarlos al microscopio óptico. Filamentación se refiere a un aumento de 50 a 100 veces en el largo de los bacilos.

(-) ausencia de bacterias en los campos analizados.

TABLA 8

Cepas bacterianas	R a d i a c i ó n		
	0 seg.	10 seg.	25 seg.
(C600) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	bacilos	bacilos	bacilos
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	bacilos	bacilos	bacilos
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	bacilos	bacilos	bacilos
(377) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>-</sup>	bacilos	filamentos	filamentos
(NS340) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>vurB</u>	bacilos	bacilos	-
(SF13504) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>uvrB</u>	bacilos	filamentos	-
(SG20) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> ::tn10	bacilos	filamentos	filamentos
(347) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>+</sup>	bacilos	filamentos	filamentos

FIGURA 5. Morfología de las cepas lon<sup>+</sup>. Morfología de bacterias crecidas sin ser sometidas a irradiación. Las células se crecieron en medio LB líquido hasta fase exponencial y posteriormente se resuspendieron en un regulador de fosfatos. Se tomó una muestra para hacer las preparaciones que se observaron al microscopio óptico por contraste de fases utilizando el objetivo 100X. Esta fotografía corresponde a la cepa (359) ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup>.

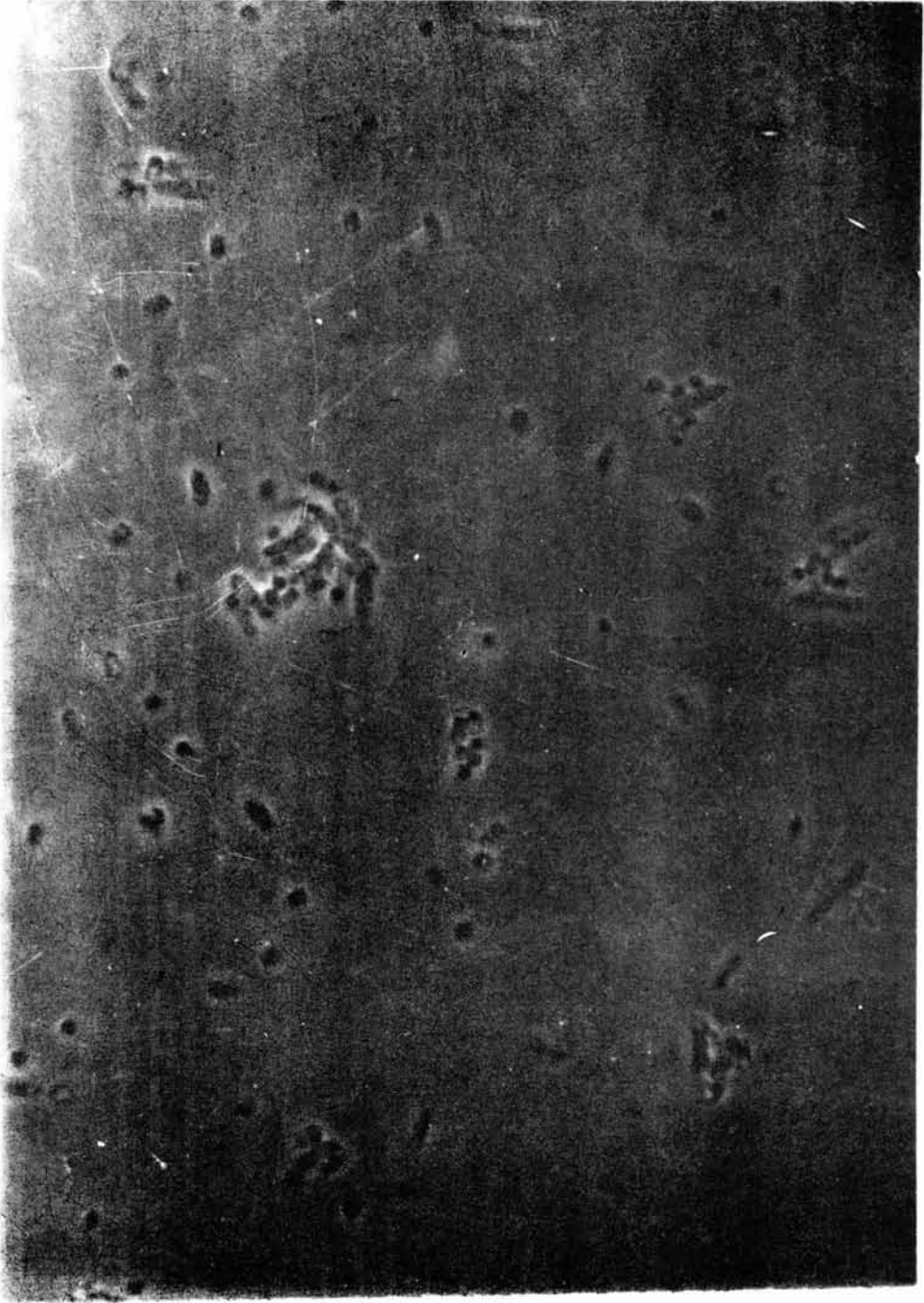


FIGURA 6. Morfología de las cepas lon<sup>-</sup>. Morfología de las bacterias crecidas en ausencia de irradiación. Las células se crecieron en medio LB líquido hasta fase exponencial y posteriormente se resuspendieron en un regulador de fosfatos. Se tomó una muestra para hacer las preparaciones que se observaron al microscopio por contraste de fases utilizando el objetivo 100X. Esta fotografía corresponde a la cepa (377) lon<sup>-</sup>.

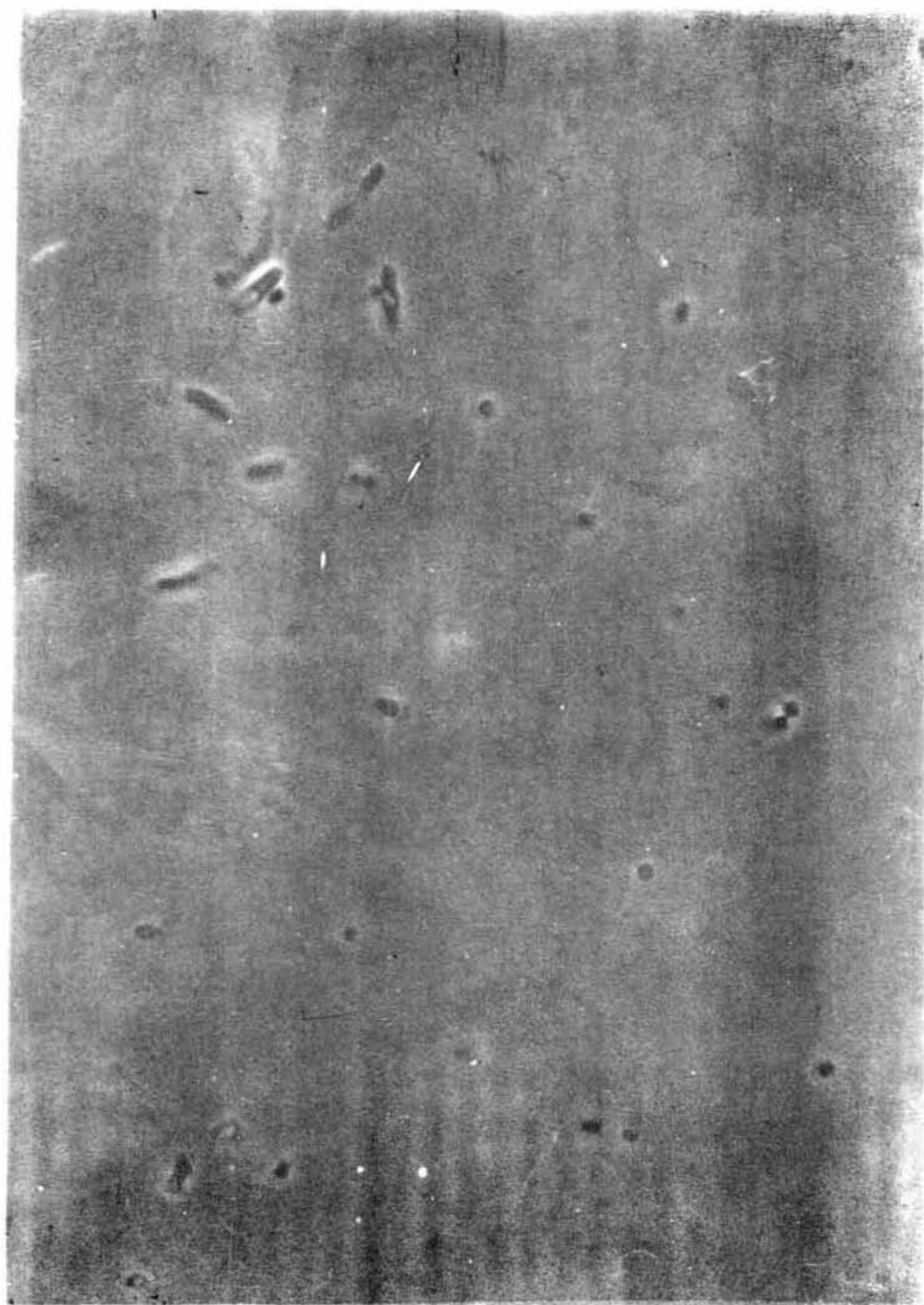




FIGURA 7. Morfología de las cepas  $lon^+$  irradiadas con luz U.V.

Las cepas  $lon^+$  irradiadas con luz ultravioleta no presentan filamentación. Las células una vez resuspendidas en un regulador de fosfatos se irradiaron con luz U.V. por 25 segundos; posteriormente se transfirieron a medio LB líquido y se incubaron con agitación durante un período de 3 a 5 horas. Finalmente, se tomó una muestra para observarse al microscopio óptico por contraste de fases, utilizando el objetivo 100X. Esta fotografía corresponde a la cepa (359)  $ron^-lon^+$ .



- 60 -

cepas probadas se observó filamentosidad hasta alcanzar un tamaño de alrededor de 100 veces el tamaño normal (Figura 8). En el caso de la cepa  $\text{lon}^-$  SG13504 y la cepa  $\text{lon}^+$  NS340 no se detectaron bacterias en los campos analizados, debido a que estas bacterias poseen la mutación  $\text{vvrB}$  siendo más sensibles a la radiación.

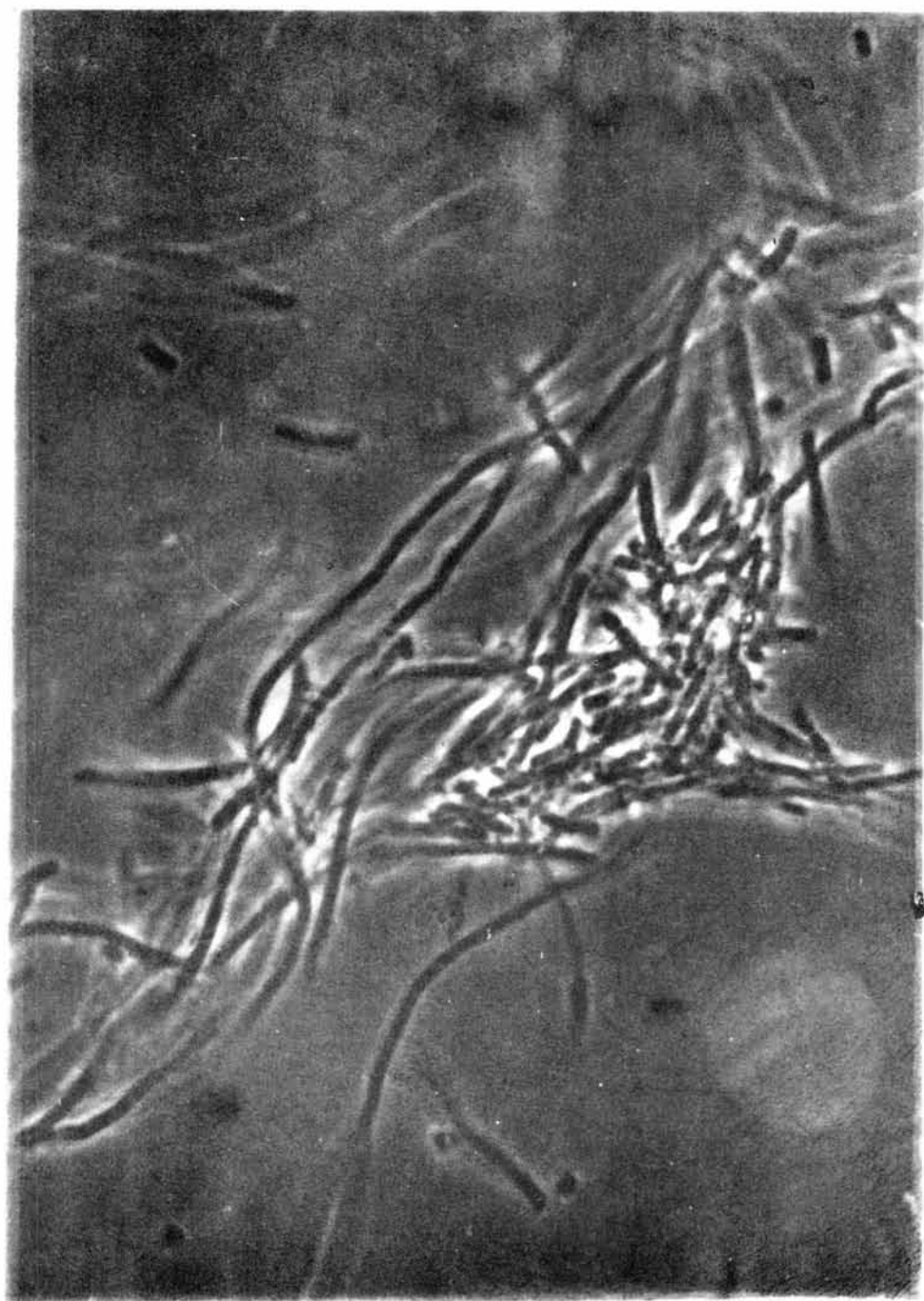
III. Construcción de cepas bacterianas . Como se mencionó con anterioridad dentro de los objetivos que nos planteamos se encontraba la construcción de una serie de cepas isogénicas,  $\text{ron}^+\text{lon}^+$ ,  $\text{ron}^-\text{lon}^+$ ,  $\text{ron}^+\text{lon}^-$  y  $\text{ron}^-\text{lon}^-$  con la finalidad de analizar en ellas la antiterminación de la transcripción de bacteriófagos lambdoides que presentan diferentes mutaciones en pN.

Una vez que se identificaron y caracterizaron las cepas isogénicas  $\text{ron}^+$  y  $\text{ron}^-$ , además de 4 cepas mutantes  $\text{lon}$ , procedimos a realizar las construcciones de las cepas isogénicas necesarias para nuestro estudio.

La construcción de las cepas bacterianas se realizó mediante la técnica de transducción generalizada mediada por el bacteriófago P1 cm (portador de resistencia a cloramfenicol) que se describe en la sección de Material y Métodos. Las cepas (358)  $\text{ron}^+\text{lon}^+$  y (359)  $\text{ron}^-\text{lon}^+$  se utilizaron como receptoras y se eligieron 2 de las 4 cepas  $\text{lon}^-$  como donadoras; de la mutación  $\text{lon}^-$ ; la 377 ( $\text{lon}^- \text{proC}^+$ ) y la SG20 ( $\text{lon}^-::\text{tn10}$ ).

FIGURA 8. Morfología de las cepas  $\text{lon}^-$  irradiadas con luz U.V.

Las cepas  $\text{lon}^-$  irradiadas con luz ultravioleta presentan filamentación. Las células resuspendidas en un regulador de fosfatos se irradiaron con luz U.V. durante 25 segundos, posteriormente se cambiaron a medio LB líquido y se incubaron con agitación por un período de 3 a 5 horas. Finalmente se tomó una muestra para observarse al microscopio óptico por contraste de fases, utilizando el objetivo 100X. Esta fotografía corresponde a la cepa (SG20)  $\text{ron}^+ \text{lon}^- :: \text{tn10}$ .



a) Construcción de la cepa  $\text{ron}^- \text{lon}^-$ . La primera construcción que se realizó fue la de la doble mutante  $\text{ron}^- \text{lon}^-$ . La obtención de esta doble mutante bacteriana nos permitió contar con un sistema donde aumenta la vida media de pN (a causa de la mutación  $\text{lon}$ ), y se forma un complejo alterado entre la RNAPol y pN (debido a la mutación  $\text{ron}$ ).

Cuando se inició esta construcción no se contaba con la cepa (SG20)  $\text{lon}^-::\text{tn10}$  que hubiera facilitado la selección de transductantes  $\text{lon}^-$  utilizando la resistencia a tetraciclina que confiere el transposon  $\text{tn10}$ ; por lo tanto decidimos utilizar como marcador genético al gen  $\text{proC}$  situado cerca del gen  $\text{lon}$  en el cromosoma bacteriano (minutos 8 y 9 respectivamente). La primera cepa que se construyó fue la  $\text{ron}^- \text{proC}^-$  para posteriormente construir la cepa  $\text{ron}^- \text{lon}^-$ .

La cepa (509)  $\text{lacZ}::\text{tn10proC}^-$  donadora del carácter  $\text{proC}^-$  fue infectada con el bacteriófago P1cm y se seleccionaron las bacterias lisógenas para este bacteriófago por su resistencia a cloramfenicol. Posterior a la inducción de una de las lisógenas se obtuvo el lisado del bacteriófago con el cual se transdujo la mutación  $\text{proC}$  a la cepa receptora (359)  $\text{ron}^- \text{proC}^+$ . Se seleccionaron las bacterias transductantes en base a su resistencia a tetraciclina en cajas de LB-Tc. Debido a que en la cepa 509, el transposon  $\text{tn10}$  se encuentra cerca del gene  $\text{lacZ}$ ; (minuto 8 del cromosoma bacteriano) es posible obtener transductantes resistentes a tetraciclina que lleven el carácter  $\text{proC}^-$  (minuto 9 del cromosoma bacteriano). Se purificaron las transductantes y se seleccionaron aquellas que se comportaban como  $\text{proC}^-$  por replica en cajas de medio mínimo con y sin prolina.

En las Tablas 9 y 10 se muestran los resultados de las pruebas para auxotrofia de prolina y sensibilidad a tetraciclina respectivamente, que se aplicó a las cepas bacterianas utilizadas en esta construcción, se incluyó la cepa C600 como un control proC<sup>+</sup>, sensible a tetraciclina. En la Tabla 11 se observan los resultados al analizar la resistencia a cloramfenicol que presentaron las cepas 509 y 377 antes y después de ser lisogenizadas por el bacteriófago P1 cm.

Una vez obtenida la cepa (BCV20) ron<sup>-</sup>proC<sup>-</sup>::tn10 se procedió a transducirle la mutación lon. Esto se llevó a cabo infectando con el bacteriófago P1 cm a la cepa (377) lon<sup>-</sup>proC<sup>+</sup> donadora del carácter lon<sup>-</sup> y seleccionando a las bacterias lisógenas para P1 cm por su resistencia a cloramfenicol. Posteriormente, después de llevar a cabo la inducción del fago, se obtuvo el lisado de los bacteriófagos y con la suspensión fágica se infectó a la cepa (BCV20). Se seleccionaron las transductantes de interés como protótrofas para prolina en cajas de medio mínimo sin prolina. De las colonias que presentaron apariencia mucoides se purificaron tres para su posterior caracterización.

En la Figura 9 se describe de manera resumida la serie de pasos que se siguieron en la construcción de la cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>. La frecuencia de transducción obtenida en la transferencia de la mutación proC<sup>-</sup> así como de la mutación lon<sup>-</sup> fue de 10<sup>-6</sup> células/ml. El porcentaje de cotransducción entre proC<sup>-</sup> y el transposon tn10 fue del 1% mientras que la cotransducción entre lon<sup>-</sup> y proC fue del 25%.

TABLA 9. Caracterización de cepas bacterianas  $pro^+$  y  $proC^-$ .

Las bacterias que se eligieron para ser utilizadas en la construcción de la cepa (BCV20)  $ron^-proC^-tn10$  fueron analizadas para su genotipo  $proC$ . A partir de cultivos frescos de las bacterias señaladas se tomaron inóculos y se sembraron por estria en cajas con los medios señalados. Se incubaron las cajas durante una noche a  $37^\circ C$ .

(+) crecimiento

(-) ausencia de crecimiento



TABLA 9

CEPAS BACTERIANAS	Luria	CRECIMIENTO Medio mínimo	
		Prolina	Sin prolina
(377) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>-</sup>	+	+	+
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	+	+	+
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	+	+	+
(C600) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	+	+	+
(509) <u>lacZ</u> ::tn10 <u>proC</u> <sup>-</sup>	+	+	-

TABLA 10. Sensibilidad de las cepas bacterianas a tetraciclina. Se analizó la resistencia a tetraciclina de las bacterias que se eligieron para ser utilizadas en las construcciones de las cepas (BCV1), (BCV18), (BCU21), (BCB20) y (BCV04). A partir de cultivos frescos se tomaron inóculos y se sembraron por estría en cajas de medio LB y LB-Tc. Las cajas se incubaron por una noche a 37°C.

(+) crecimiento

(-) ausencia de crecimiento

TABLA 10

CEPAS BACTERIANAS	CRECIMIENTO	
	Luria	Luria tetraciclina
(509) <u>lacZ</u> :: <u>tn10</u>	+	+
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	+	-
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	+	-
(SG20) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> :: <u>tn10</u>	+	+
(100) <u>supF</u> :: <u>tn10</u>	+	+
(BCV1) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lac</u> <sup>-</sup>	+	-
(CSH26) <u>supU</u> :: <u>tn10</u>	+	+
(C600) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>supE</u>	+	-
(BCV20) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>proC</u> <sup>-</sup> :: <u>tn10</u>	+	+

TABLA 11. Resistencia a cloramfenicol de las cepas bacterianas lisógenas para Plcm. Las cepas 377, 100, 509 y SG20, se lisogenizaron con el bacteriófago Plcm. Las lisógenas fueron identificadas como bacterias resistentes a cloramfenicol. Se crecieron las bacterias en medio LB por una noche a 37°C; a partir de estos cultivos se sembró por estría en cajas de LB y LB-cm, incubándose posteriormente durante una noche a 37°C.

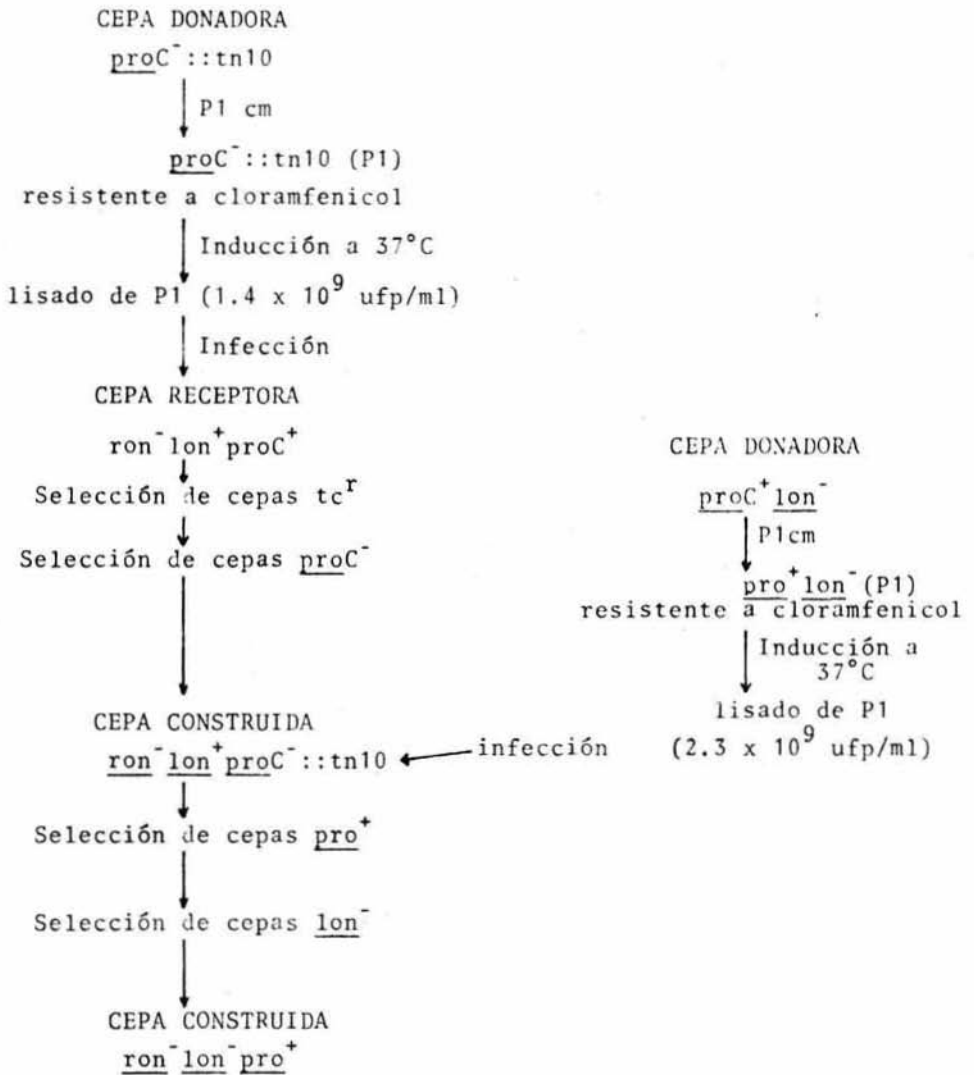
(+) crecimiento

(-) ausencia de crecimiento

TABLA 11

Cepas bacterianas	Luria	Luria cloramfenicol
(C600) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>supE</u>	+	-
(377) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lac</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>-</sup>	+	-
(100) <u>supF</u> ::tn10	+	-
(509) <u>lacZ</u> ::tn10	+	-
(SG20) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> ::tn10	+	-
(377) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lac</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>-</sup> (Plcm)	+	+
(100) <u>supF</u> ::tn10 (Plcm)	+	+
(509) <u>lacZ</u> ::tn10 (Plcm)	+	+
(SG20) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> ::tn10 (Plcm)	+	+

FIGURA 9. Construcción de la cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>. Para la construcción de la cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> fue necesario construir previamente la cepa ron<sup>-</sup>proC<sup>-</sup>tn10. Las cepas donadoras fueron las siguientes: para la mutación proC<sup>-</sup> la cepa (509) lacZ::tn10proC<sup>-</sup> y para la mutación lon<sup>-</sup> la cepa (377) ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup>proC<sup>+</sup>. Las cepas receptoras fueron la (359) ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup>proC<sup>+</sup> y la (BCV20) ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup>proC<sup>-</sup> respectivamente. Los lisados de Plcm se titularon en la cepa C600. La selección de cepas resistentes a tetraciclina y a cloramfenicol se realizó en cajas de LB-tc y LB-cm respectivamente. La selección de cepas proC<sup>+</sup> y proC<sup>-</sup> se efectuó en cajas de medio mínimo con y sin prolina. La selección de cepas lon<sup>-</sup> se detalla posteriormente. Frecuencia de transducción: número de colonias en el medio selectivo/número de colonias en medio LB. Frecuencia de cotransducción: número de colonias que presentaron el carácter transducido/número de colonias en el medio selectivo.



b) Construcción de la cepa  $\text{ron}^+\text{lon}^-$ . Para la obtención de esta cepa se utilizó como donadora de la mutación lon a la cepa (SG20) lon<sup>-</sup>::tn10. Esta cepa fue infectada con el bacteriófago P1 cm y se seleccionaron a las lisógenas para P1 cm en base a su resistencia a cloramfenicol, posteriormente, mediante inducción se obtuvo el lisado del bacteriófago con el cual se realizó la transducción de el carácter lon<sup>-</sup> a la cepa receptora (358) ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup>. Las bacterias transductantes se seleccionaron como resistentes a tetraciclina en cajas de LB-tc. Debido a que en la cepa SG20 el marcador tn10 se encuentra cerca del gen lon se esperaba una frecuencia de cotransducción alta, por este motivo se decidió purificar exclusivamente 5 transductantes. Los candidatos obtenidos se sembraron en medio mínimo y se seleccionó uno de ellos que presentaba apariencia mucóide, para su posterior caracterización.

Los resultados de sensibilidad a tetraciclina de las cepas SG20 y 358 se muestran en la Tabla 10, mientras que los resultados para resistencia a cloramfenicol de la cepa SG20 antes y después de ser lisogenizada por el bacteriófago P1 cm se muestran en la Tabla 11.

En la Figura 10 se describe de manera resumida los pasos que se siguieron en la construcción de la cepa ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup>. La frecuencia de transducción de la mutación lon fue de  $10^{-6}$  cel/ml la frecuencia de cotransducción de esta mutación con el transposon tn10 fue del 20%.



FIGURA 10. Construcción de la cepa  $\text{ron}^+\text{lon}^-$ . Para la construcción de la cepa  $\text{ron}^+\text{lon}^-$  se llevó a cabo la transducción del carácter  $\text{lon}^-$  con el transposón  $\text{tn10}$ . La cepa (SG20)  $\text{ron}^+\text{lon}^-::\text{tn10}$  fue la donadora del marcador  $\text{lon}^-$ . La cepa receptora fue la (358)  $\text{ron}^+\text{lon}^+\text{lac am}$ . La selección de las cepas resistentes a cloramfenicol y a tetraciclina se efectuó en cajas de LB-cm y LB-tc respectivamente. La selección de las cepas  $\text{lon}^-$  se detalla posteriormente. El lisado de P1 cm se tituló en una cepa C600. Frecuencia de transducción. No. de colonias en medio LB-tc/No. de colonias en medio LB. Frecuencia cotransducción. No. de colonias que presentaron la mutación  $\text{lon}$ /No. de clonias en LB-tc.

CEPA DONADORA

lon<sup>-</sup> :: tn10

↓ P1 cm

lon<sup>-</sup> :: tn10 (P1)

resistente a cloramfenicol

↓ inducción a 37°C

lisado de P1

2.7 x 10<sup>9</sup> u.f.p./ml

↓ infección

CEPA RECEPTORA

ron<sup>+</sup> lon<sup>+</sup>

↓ Selección de cepas tc<sup>r</sup>

↓ Selección de cepas lon<sup>-</sup>

CEPA CONSTRUIDA

ron<sup>+</sup> lon<sup>-</sup> :: tn10

IV. Caracterización de las cepas transductantes  $ron^+lon^-$ .

Como se mencionó con anterioridad, durante la construcción de las cepas  $ron^+lon^-$  y  $ron^-lon^-$  se seleccionaron aquellas transductantes que presentaron apariencia mucóide en medio mínimo, aunque este tipo de crecimiento es una propiedad de las mutantes  $lon$ , se procedió a realizar una caracterización más completa de estas bacterias. Se utilizó la metodología montada para la identificación de cepas  $lon^-$  que se describió previamente.

Se caracterizaron transductantes  $ron^-lon^-$ ; BCV1, BCV18, BCV21 y a la transductante  $ron^+lon^-$ , BCV4.

a) Inhibición del crecimiento de las cepas  $ron^+lon^-$  y  $ron^-lon^-$  por nitrofurantoina. Las cepas bacterianas por analizar se crecieron por estría en cajas de medio LB y LB-nitrofurantoina, las cuales fueron incubadas por una noche a 37°C, al día siguiente se evaluó el crecimiento bacteriano. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 12; se observa que las transductantes BCV1, BCV18, BCV21 y BCV4 presentaron un comportamiento idéntico al de las cepas  $lon^-$  que se utilizaron como control, es decir son incapaces de crecer en cualquiera de las concentraciones de nitrofurantoina. Esto nos indicó que portaban la mutación  $lon$  que les confiere una sensibilidad acentuada al antibiótico.

Como se había notado anteriormente, a una concentración de 10 µg/ml de nitrofurantoina las cepas  $lon^+$  también son inhibidas. El comportamiento de la cepa N5340 fue discutido previamente.

TABLA 12. Inhibición del crecimiento de las cepas  $\text{ron}^+\text{lon}^-$  y  $\text{ron}^-\text{lon}^-$  por nitrofurantoina. Se analizó la sensibilidad a nitrofurantoina de las cepas  $\text{ron}^+\text{lon}^-$  y  $\text{ron}^-\text{lon}^-$  construidas por transducción. Las cepas construidas se comportan idénticamente a las mutantes lon usadas como control, son inhibidas a cualquiera de las concentraciones de nitrofurantoina. A partir de cultivos frescos se sembraron por estría inóculos de las bacterias de interés en cajas de medio LB y LB-nitrofurantoina, utilizando diferentes concentraciones del antibiótico. Las cajas se incubaron por una noche a 37°C.

(+) crecimiento bacteriano

(-) ausencia de crecimiento

TABLA 12

CEPAS BACTERIANAS		Luria	CRECIMIENTO		
			Nitrofurantoina		
			5 µg/ml	8.3 µg/ml	10 µg/ml
(BCV1)	<u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	+	-	-	-
(BCV18)	<u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	+	-	-	-
(BCV21)	<u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	+	-	-	-
(BCV4)	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	+	-	-	-
(358)	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	+	+	+	-
(359)	<u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	+	+	+	-
(377)	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	+	-	-	-
(SG20)	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> ::tn10	+	-	-	-
(SG13504)	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>uvrB</u>	+	-	-	-
(N5340)	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>uvrB</u>	+	-	-	-
(C600)	<u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	+	+	+	-

b) Filamentación de las cepas  $ron^+lon^-$  y  $ron^-lon^-$  inducidas por luz U.V. Se tomaron cultivos bacterianos de las cepas a probar crecidos en fase exponencial y se resuspendieron en un regulador de fosfatos, se irradiaron con luz ultravioleta y posteriormente se incubaron con agitación en medio LB líquido por un período de 3 a 5 horas. Al cabo de este lapso se montaron las preparaciones de las bacterias y se observaron al microscopio óptico.

En los resultados presentados en la Tabla 13, se observa que el comportamiento de las transductantes probadas: BCV1, BCV18, BCV21 y BCV4 es semejante al de las mutantes lon empleadas como control. Antes de ser irradiadas, todas las bacterias presentaron la morfología típica de bacilo de las cepas silvestres; el fenotipo de filamentación característica de mutantes lon se presentó después de llevar a cabo la irradiación.

Cuando el tiempo de exposición fue de 25 segundos, la filamentación fue más marcada tanto en las cepas lon que se emplearon como control, como en las transductantes ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup> (Figura 11) y ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> (Figura 12).

En base a las pruebas anteriores se concluyó que las transductantes obtenidas portaban la mutación lon. En este momento se tuvo completo el juego de cepas isogénicas ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup>, ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup>, ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup> y ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>.

V. Efecto de las mutaciones  $ron^-lon^-$  en el desarrollo de bacteriófagos con fenotipo mar. Como se mencionó anteriormente se ha reportado la deficiencia en el crecimiento de bacteriófagos lambdoides en una cepa ron<sup>-</sup>, que es debida a una interacción

TABLA 13. Filamentación de las cepas  $\text{ron}^+\text{lon}^-$  y  $\text{ron}^-\text{lon}^-$  inducida por luz ultravioleta. Se analizó la formación de filamentos por las cepas  $\text{ron}^+\text{lon}^-$  y  $\text{ron}^-\text{lon}^-$  después de la irradiación con luz ultravioleta. Las cepas construidas forman filamentos al igual que las mutantes  $\text{lon}^-$  utilizadas como control. Las cepas  $\text{lon}^+$  crecen como bacilos. \*Tiempo de irradiación con luz ultravioleta.

TABLA 13

CEPAS BACTERIANAS	MORFOLOGIA		
	0 seg de irradiación	10 seg.	25 seg.
(BCV1) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	bacilos	filamentos	filamentos
(BCV21) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	bacilos	filamentos	filamentos
(BCV18) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	bacilos	filamentos	filamentos
(BCV41) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	bacilos	filamentos	filamentos
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	bacilos	cocobacilos	cocobacilos
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	bacilos	cocobacilos	cocobacilos
(377) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>gal</u> <sup>-</sup>	bacilos	filamentos	filamentos
(N5340) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>uvrB</u>	bacilos	cocobacilos	-
(SG13504) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>uvrB</u>	bacilos	filamentos	-
(SG20) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> ::tn10	bacilos	filamentos	filamentos
(C600) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	bacilos	cocobacilos	cocobacilos

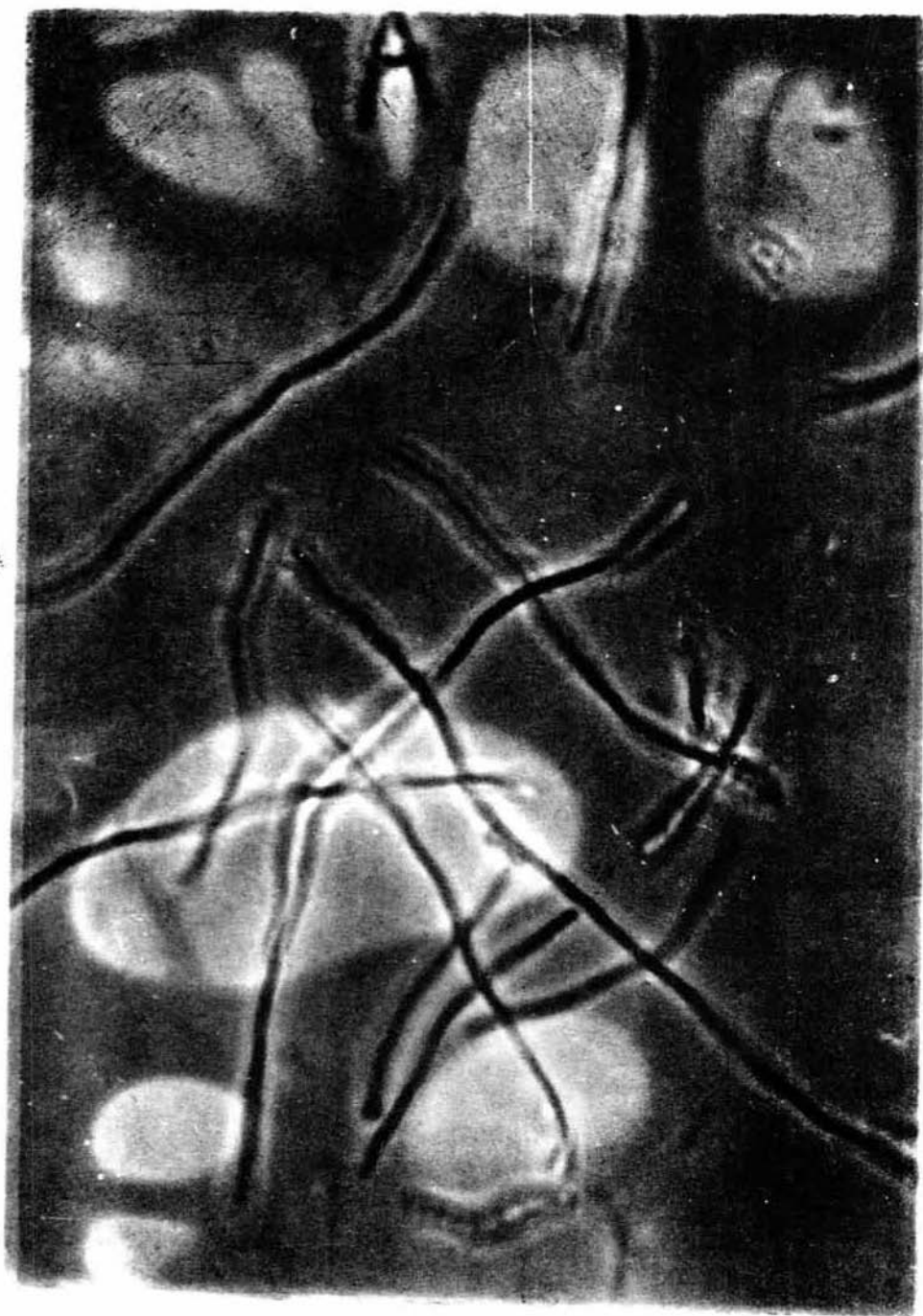


FIGURA 11. Filamentación en las cepas transductantes  $\text{ron}^+\text{lon}^-$ .  
Las bacterias  $\text{lon}^-$  forman filamentos después de ser irradiadas con luz ultravioleta. La cepa  $\text{ron}^+\text{lon}^-$  construida presentó el mismo comportamiento que las cepas  $\text{lon}^-$  usadas como control. Las células se resuspendieron en un regualdor de fosfatos, se irradiaron con luz U.V. durante 25 segundos se cambiaron a medio LB líquido y se incubaron con agitación por un período de 3 a 5 horas. Finalmente, se tomó una muestra para observarse al microscopio óptico por contraste de fases utilizando el objetivo 100X. Esta fotografía corresponde a la cepa BCV 4  $\text{ron}^+\text{lon}^-$ .



FIGURA 12. Filamentación en la cepa transductante ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>.

La cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> construida en este trabajo fue analizada para la formación de filamentos después de irradiarla con luz ultravioleta. Su comportamiento fue idéntico al de las cepas lon<sup>-</sup> usadas como control. Las células resuspendidas en un regulador de fosfatos, se irradiaron con luz U.V. por 25 segundos, posteriormente se cambiaron a medio LB líquido en agitación durante un período de 3 a 5 horas. Finalmente se tomó una muestra para observarse al microscopio óptico por contraste de fases utilizando el objetivo 100X. Esta fotografía corresponde a la cepa (BCV1) ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>.



deficiente entre la RNA polimerasa y pN (18). Varios autores han sugerido que la estabilidad de pN puede ser un factor importante en la formación del complejo RNAPol pN y por ende en la eficiencia de la antiterminación de la transcripción; Vaca y Sosa (comunicación personal) siguiendo esta dirección estudiaron el efecto de la mutación lon<sup>-</sup> (aumenta la estabilidad de pN) en el desarrollo de bacteriófago  $\lambda$  N7mar3 en una cepa ron<sup>-</sup> lon<sup>-</sup> sup<sup>+</sup>. Encontraron que este bacteriófago si presentó crecimiento, lo que les indicó que en ausencia de Lon el complejo formado entre la RNAPol ron<sup>-</sup> y pNmar es funcional para lograr la antiterminación de la transcripción. En base a estos resultados ellos postularán que la unión entre la RNA polimerasa y pN protege a esta contra la degradación de plon, por esta razón cuando el complejo se encuentra alterado y Lon está presente la degradación de pN es tal que se inhibe completamente el desarrollo del bacteriófago.

De estos resultados se deduce además que un aumento en la vida media de pN mejora la eficiencia en la antiterminación de la transcripción, a tal grado que un complejo entre pN y la polimerasa formado por proteínas alteradas puede ahora ser funcional.

Decidimos reproducir estos resultados construyendo cepas isogénicas y utilizando diferentes mutantes mar con la finalidad de evaluar a fondo las observaciones anteriores. Se utilizaron los bacteriófagos  $\lambda$ cI857,  $\lambda$ imm434mar1 y  $\lambda$ bio256mar4, y las cepas isogénicas construidas: ron<sup>+</sup> lon<sup>+</sup>, ron<sup>-</sup> lon<sup>+</sup>, ron<sup>+</sup> lon<sup>-</sup>, ron<sup>-</sup> lon<sup>-</sup>.

Como se observa en la Tabla 14, los bacteriófagos mar probados ( $\lambda$ bio256mar4 y  $\lambda$ imm434mar1) presentan crecimiento en las

TABLA 14. Efecto de las mutaciones  $ron^-lon^-$  en el desarrollo de bacteriófagos con fenotipo Mar. Cepas bacterianas  $ron^-lon^-$  no permiten el desarrollo de algunos bacteriófagos Nmar ( $\lambda_{bio256mar4}$  y  $\lambda_{imm434mar1}$ ) 100  $\mu$ l de cultivos frescos de bacteria se infectaron con 100  $\mu$ l de las diferentes diluciones de los bacteriófagos ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) se permitió la absorción por 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 2.5 ml de TØ suave y se virió la mezcla en cajas de TØ que fueron incubadas una noche a 37° C.

Los números presentados corresponden a u.f.p./ml

(-) ausencia de placas

TABLA 14

CEPAS BACTERIANAS	DESARROLLO DE BACTERIOFAGOS		
	$\lambda_{cI857}$	$\lambda_{bio256 \text{ mar}}$	$\lambda_{imm434 \text{ mar}}$
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	$2.1 \times 10^{10}$	$1.8 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lacam</u>	$3.2 \times 10^{10}$	-	-
(BCV4) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	$3.3 \times 10^{10}$	$1.6 \times 10^9$	$1.8 \times 10^9$
(BCV1) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	$1.0 \times 10^{10}$	-	-
(BCV18) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	$1.9 \times 10^{10}$	-	-
(BCV21) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lacam</u>	$1.7 \times 10^{10}$	-	-
(100) <u>supF::tn10</u>	$1.1 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^9$	$1.2 \times 10^9$

cepas ron<sup>+</sup> (358 y BCV4), pero no en la cepa ron<sup>-</sup> (359); sin embargo a diferencia de lo encontrado por Sosa y Vaca, en las cepas ron<sup>-</sup> lon<sup>-</sup> (BCV1, BCV18 y BCV21) el fenotipo Mar no revierte, las mutantes mar1 y mar4 siguen sin poder desarrollarse.

De estos resultados se concluye que una mayor estabilidad de pN no suple la interacción deficiente que ocurre entre la RNA polimerasa y pN (mar1 y mar4).

Cabe mencionar que los resultados de Sosa y Vaca se utilizó el bacteriófago  $\lambda$ N7mar3, el cual no fue probado en este experimento debido a que no se contaba con una cepa ron<sup>-</sup> lon<sup>-</sup> supresora de mutaciones ambar. Esta cepa es necesaria para suprimir la mutación N7 y poder observar el fenotipo Mar de este bacteriófago.

#### VI. Antiterminación de la transcripción en cepas lon<sup>+</sup>/lon<sup>-</sup>.

En los experimentos anteriores no se encontró evidencias de que una mayor estabilidad en pN mejorará la eficiencia de la antiterminación de la transcripción, sin embargo nosotros decidimos analizar esta hipótesis siguiendo otra estrategia. Se utilizó un sistema donde el desarrollo del bacteriófago lambdaoide fuera más dependiente de pN con la finalidad de detectar si cambios en la estabilidad de esta proteína se reflejaban en la antiterminación de la transcripción. Se empleó un bacteriófago  $\lambda$ imm434 que lleva a la izquierda de los genes para replicación del DNA (O y P) la inserción r32 (Figura 1). La inserción r32 contiene un terminador de la transcripción dependiente de Rho, este terminador responde a la acción de pN provocando que el desarrollo de este bacteriófago sea más dependiente de esta proteína.



Se infectaron las cepas bacterianas con los bacteriófagos  $\lambda$  imm434r32 y  $\lambda$  cI857 como control, y se analizó el desarrollo de estos bacteriófagos. En la Tabla 15 se observa que el número de unidades formadoras de placa en las infecciones con el bacteriófago  $\lambda$ imm434r32 es similar en todas las cepas bacterianas, sin embargo el tamaño de las placas líticas si presenta diferencias entre las bacterias. En la cepa (359) ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup> se obtienen placas pequeñas con respecto a las que se forman en las cepas ron<sup>+</sup>. Este resultado nos indica que la disminución en la producción de partículas fágicas, probablemente se deba a una interacción deficiente entre la RNA polimerasa mutante (cepa ron<sup>-</sup>) y pN durante la antiterminación de la transcripción. Cabe mencionar que la deficiencia en la polimerasa de la cepa ron<sup>-</sup> solo se evidenciaba cuando se infectaba con un bacteriófago mar<sup>-</sup>, sin embargo en este sistema donde el bacteriófago  $\lambda$ imm434r32 depende altamente de pN fue posible detectar fallas menores en la interacción RNApol-pN.

Si un aumento en la vida media de pN causara un aumento en la eficiencia de la antiterminación de la transcripción se esperaría que en la cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> el bacteriófago  $\lambda$ imm434r32 aumentara la producción de partículas fágicas, reflejándose en un mayor tamaño de las placas líticas. Sin embargo en las cepas BCV1, BCV18 y BCV21 el tamaño de las placas líticas fue tan pequeño como el observado en la cepa (359) ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup> en donde la estabilidad de pN es menor.

Los resultados obtenidos en este experimento, permitieron concluir que una vida media mayor de pN no aumenta la eficiencia en la antiterminación de la transcripción en un complejo pN-polimerasa alterado.

TABLA 15. Efecto de la RNA polimerasa  $ron^-$  en la eficiencia de plaqueo de los bacteriófagos lambdoides,  $\lambda$ cI857 y  $\lambda$ imm434r32.  
Se analizó el efecto de las mutaciones  $ron$   $lon$ , en un sistema sobre-dependiente de la proteína N.

Se tomaron 100  $\mu$ l de bacteria fresca, a los cuales se añadieron 100  $\mu$ l de diferentes diluciones de los bacteriófagos ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) y se permitió la absorción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 2.5 ml de T $\phi$  suave y se vació la mezcla en cajas de T $\phi$  suave. Las cajas se incubaron durante una noche a 37°C. Al día siguiente se evaluó el número y tamaño de las placas líticas.

TABLA 15

Cepas bacterianas	Bacteriófagos			
	$\lambda$ C1587		$\lambda$ inm434r32	
	u.f.p/ml	tamaño de placa	u.f.p/ml	tamaño de placa
(C600) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	$3.3 \times 10^{10}$	normal	$4.1 \times 10^{10}$	normal
(54) <u>SupF</u> (inm434)	$2.2 \times 10^{10}$	normal	-	-
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	$2.8 \times 10^{10}$	normal	$5.2 \times 10^{10}$	normal
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup>	$2.3 \times 10^{10}$	normal	$6.0 \times 10^{10}$	pequeña
(BCU4) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup>	$2.4 \times 10^{10}$	normal	$4.3 \times 10^{10}$	normal
(BCV1) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup>	$3.1 \times 10^{10}$	normal	$3.4 \times 10^{10}$	pequeña
(BCV18) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup>	$1.8 \times 10^{10}$	normal	$2.8 \times 10^{10}$	pequeña
(BCV21) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup>	$1.4 \times 10^{10}$	normal	$3.2 \times 10^{10}$	pequeña

VII. Actividad de la proteína N7 en la antiterminación de la transcripción. Las mutantes lon se han caracterizado también por su habilidad para estabilizar proteínas incompletas o modificadas. Se ha probado que las cepas lon<sup>-</sup> permiten el crecimiento de bacteriófagos mutantes sensibles a la temperatura en condiciones restrictivas, como es el caso de los fagos  $\lambda$ Ots y el  $\lambda$ Pts. Esto sugiere que la destrucción de las proteínas mutadas por parte de la proteasa Lon se suma al defecto que presentan estos bacteriófagos en su crecimiento (21).

Nosotros decidimos probar si el defecto que presentan en su crecimiento diferentes bacteriófagos lambda con mutaciones ambar en pN se debe a su funcionalidad deficiente ó a la degradación que sufren por parte de la proteasa Lon.

Se infectaron diferentes cepas bacterianas con los bacteriófagos  $\lambda$ N7,  $\lambda$ N53 y  $\lambda$ cI857 (como control), se permitió la absorción y se colocaron las muestras en cajas de T $\emptyset$ , los resultados se presentan en al Tabla 16.

El bacteriófago  $\lambda$ N7 que es incapaz de crecer en las cepas que no presentan un supresor de mutaciones ambar, sí presenta crecimiento en las cepas ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>, las u.f.p./ml que forma son similares a las que forma en una cepa supresora. Sin embargo la producción de partículas fágicas es menor, esto se refleja en el tamaño de las placas líticas, siendo diminutas en comparación con las que se forman al suprimirse la mutación ambar. Por el contrario el bacteriófago  $\lambda$ N53 solo presentó crecimiento en la cepa supresora de mutaciones ambar.

Cabe mencionar que el bacteriófago  $\lambda$ N7 no presentó crecimiento en la cepa ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup>.

TABLA 16. Actividad de la proteína N7 en la antiterminación de la transcripción. Se analizó la actividad de los fragmentos de pN, N7 y N53 en la antiterminación de la transcripción. La proteína N7 es funcional para antiterminar en una cepa ron<sup>-</sup> lon<sup>-</sup> sup<sup>o</sup>.

Se infectaron 100  $\mu$ l de cada una de las bacterias, utilizando cultivos frescos, con 100  $\mu$ l de las diferentes diluciones de los bacteriófagos ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) se permitió la adsorción por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 2.5 ml de T $\phi$  suave. Las mezclas se vertieron en cajas de T $\phi$  suave y se incubaron por una noche a 37°C.

(-) ausencia de placas

TABLA 16

CEPAS BACTERIANAS	B A C T E R I O F A G O S					
	$\lambda$ cI857		$\lambda$ N7		$\lambda$ N53	
	u.f.p/ml	tamaño de placa	u.f.p/ml	tamaño de placa	u.f.p/ml	tamaño de placa
(26) <u>sup</u> F ( $\lambda$ )	$1.11 \times 10^{10}$	normal	$1.7 \times 10^9$	normal	$2.1 \times 10^9$	normal
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	$2.1 \times 10^{10}$	normal	-	-	-	-
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	$3.2 \times 10^{10}$	normal	-	-	-	-
(BCV4) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	$3.3 \times 10^{10}$	normal	-	-	-	-
(BCV1) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	$1.0 \times 10^{10}$	normal	$1.4 \times 10^9$	pequeña	-	-
(BCV18) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	$1.9 \times 10^{10}$	normal	$1.8 \times 10^9$	pequeña	-	-
(BCV21) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	$1.7 \times 10^{10}$	normal	$1.0 \times 10^9$	pequeña	-	-

Estos resultados sugieren que el fragmento de pN que se produce en la mutación N7 (aproximadamente 70% con respecto a la proteína normal) es funcional para lograr la antiterminación de la transcripción en ausencia de la proteasa Lon. Esto puede ser debido a la mutación ron, ya que en la cepa ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup> no se observa el crecimiento del bacteriófago N7. De alguna forma, la estructura tridimensional que toman ambas proteínas alteradas favorece su interacción, mientras que, la estructura tridimensional que adopta el fragmento de pN N53 (aproximadamente 25% con respecto a la proteína normal) no logra interaccionar eficientemente con ninguna de las formas de la polimerasa (ron<sup>+</sup>ron<sup>-</sup>).

Asimismo en estos resultados se muestra que un aumento en la estabilidad de pN si aumenta la eficiencia de la antiterminación de la transcripción.

Considerando la funcionalidad de la proteína N7 en una cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup>, es posible que el efecto observado por Sosa y Vaca en cuanto a la supresión del fenotipo Mar en el bacteriófago  $\lambda$ N7mar3 cuando es crecido en la cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>E</sup>, sea precisamente la actividad de esta proteína incompleta.

Evaluando lo anterior decidimos introducir en nuestras cepas isogénicas un supresor de mutaciones ambar para poder observar el fenotipo Mar de  $\lambda$ N7 y tratar de aclarar si el crecimiento observado por Sosa y Vaca en la cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>E</sup> se debe a la supresión del fenotipo Mar o a la funcionalidad de la proteína N7.

Como primer paso se probó que tipo de supresor bacteriano suprime las mutaciones N7 y N53, con la finalidad de seleccionar al supresor adecuado para las siguientes construcciones bacterianas. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Los 3 supresores probados: supE, supF y supU permiten el crecimiento de los bacteriófagos con las mutaciones ambar,  $\lambda$ N7,  $\lambda$ N53 y  $\lambda$ O29. Por lo tanto, decidimos utilizar las 2 cepas siguientes como donadoras del supresor; la (100) SupFtn10 y la (CSH26)supUtn10; esta cepa lleva el gen para el supresor dentro del plásmido pMY228, lo que le permite tener a la bacteria que lo porta un elevado número de genes para el RNAt supresor, a diferencia de la cepa 100 que porta 1 sola copia del gen supresor, debido a que lo lleva dentro del cromosoma bacteriano.

#### VIII. Construcción de cepas con supresor F de mutaciones ambar.

La cepa donadora (100) supF::tn10 fue infectada con el bacteriófago Plcm, se seleccionaron bacterias lisógenas en cajas de LB-cm, posteriormente mediante inducción se obtuvo el lisado del bacteriófago Plcm con el cual se realizó la transducción a las cepas receptoras, 358, 359 y BCV1 (cabe mencionar que esta última cepa. Por alguna razón no determinada perdió el transposon que confiere resistencia a tetraciclina que se le introdujo junto con la mutación proC) y se seleccionó las transducantes por su resistencia a tetraciclina en cajas de LB-Tc.

Los resultados obtenidos al probar la resistencia a tetraciclina de las cepas utilizadas en estas construcciones se muestran en la Tabla 10. Los resultados de resistencia a cloramfenicol de la cepa (100) supF::tn10, antes y después de lisogenizar



TABLA 17. Supresión de mutaciones ambar. Se probó la actividad de varios supresores bacterianos, para suprimir las mutaciones ambar que presentan los bacteriófagos;  $\lambda_{N7}$ ,  $\lambda_{N53}$  y  $\lambda_{O29}$ . Los 3 supresores bacterianos probados; supE, supF y supU-permiten el desarrollo de todos los bacteriófagos mutantes ambar utilizados.

Se gotearon 10  $\mu$ l de cada dilución de los bacteriófagos utilizados ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) sobre cajas de T $\phi$  que contenían un tapíz de bacteria. Las cajas se incubaron durante una noche a 37°C.

(+) crecimiento del bacteriófago

(-) ausencia de crecimiento

TABLA 17

CEPAS BACTERIANAS	DESARROLLO DE BACTERIOFAGOS			
	$\lambda_{cI857}$	$\lambda_{N7cI857}$	$\lambda_{N53}$	$\lambda_{O29}$
(100) <u>SupF</u> <u>Tn10</u>	+	+	+	+
(54) <u>SupF</u> ( <u>imm434</u> )	+	+	+	+
(C5H26) <u>SupU</u> <u>Tn10</u>	+	+	+	+
(358) <u>ron<sup>+</sup></u> <u>lon<sup>-</sup></u> <u>sup<sup>0</sup></u>	+	-	-	-
(C600) <u>supE</u>	+	+	+	+

con el bacteriófago Plcm se muestran en la Tabla 11.

Las frecuencias de transducción obtenidas en esta parte fueron de  $10^{-6}$ . Mientras que la frecuencia de cotransducción entre supF y el transposón tn10 fue de 30%. Un resumen de los pasos que se siguieron en estas construcciones se presentan en la Figura 13.

IX. Construcción de cepas con supresor U de mutaciones ambar. Para estas construcciones se utilizó el plásmido pMY228 que lleva el gen que codifica para el supresor U y una región que contiene resistencia a tetraciclina. Se realizó la extracción del plásmido a partir de la cepa CSH26 y con el DNA de éste se transformó a las células competentes de las cepas receptoras; 358, 359 y BCV1, seleccionándose las transformantes por su resistencia a tetraciclina en cajas de LB-tc. Las frecuencias de transformación obtenidas fueron de  $10^{-4}$ . Un resumen de los pasos que se siguieron para la construcción de estas cepas se presenta en la Figura 14.

X. Supresión del fenotipo Mar en el bacteriófago  $\lambda$ N7. Para que se exprese el fenotipo Mar del bacteriófago  $\lambda$ N7 es necesario que la cepa bacteriana además de presentar la mutación ron contenga un supresor de mutaciones ambar. Este supresor consiste de un RNA de transferencia que mediante el reconocimiento de los dos codones de terminación ambar que se presentan en el fago  $\lambda$ N7, introduce dos aminoácidos diferentes a los originales en la cadena polipeptídica y logra que prosiga la síntesis

FIGURA 13. Construcción de cepas con supresor F de mutaciones ambar. La cepa donadora del supF fue la (100) supF::tn10, y las cepas receptoras fueron la (358) ron<sup>+</sup> lon<sup>+</sup> lac am, la (359) ron<sup>-</sup> lon<sup>+</sup> lac am y la (BCV1) ron<sup>-</sup> lon<sup>-</sup> lac am.

La selección de las cepas resistentes a cloramfenicol y tetraciclina se efectuó en cajas de luria -Cm y Luria -Tc respectivamente.

El lisado de P1 se tituló en una cepa C600.

Las cepas que portan el supresor se seleccionaron como colonias que presentaron coloración roja en el medio Mac Conkey lactosa-Tc, excepto para la cepa (BCV1) que no presentó colonias rojas, y se seleccionó mediante plaqueo de bacteriófago mutantes ambar.

Frec. Transducción.- No de colonias en medio mac B-Tc/No. de colonias en medio Luria.

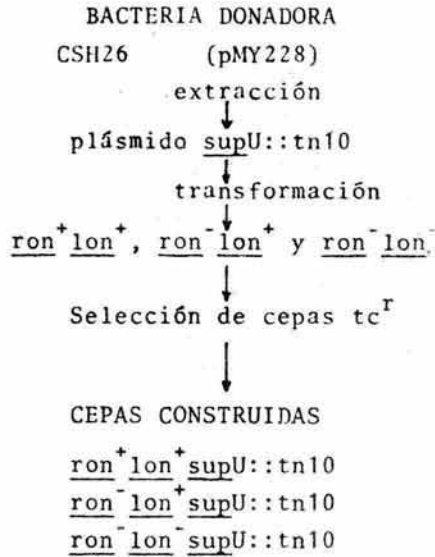
Frec. contransducción.- No de colonias con supresor/No. total de colonias resistentes a tetraciclina.

FIGURA 13



FIGURA 14. Construcción de cepas con supresor U de mutaciones ambar. Se decidió introducir un supresor de mutaciones ambar a nuestro juego de cepas isogénicas para analizar el fenotipo Mar del bacteriófago N7. La cepa CSH26 pro<sup>-</sup>lac<sup>-</sup>ara<sup>-</sup> se utilizó como donadora del plásmido pMY228, que lleva el supresor U de mutaciones ambar y una región de resistencia a tetraciclina; las cepas receptoras fueron; (358) ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup>lac<sup>-</sup>am (359) ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup>lac<sup>-</sup>am y (BCV1) ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>lac<sup>-</sup>. La metodología para la extracción de plásmido y la transformación se detalla en la sección de Material y Métodos. La selección de cepas resistentes a tetraciclina se efectuó en cajas de LB-tc. Frecuencia de transformación. Número de colonias en medio LB-tc/número de colonias en medio LB.

FIGURA 14



normal de esta proteína. Debido a que la presencia de estos aminoácidos cambiados en pN son los que dan lugar a la mutación mar, se requiere de la presencia del supresor para que esta se produzca (18).

Como se mencionó previamente nosotros no obtuvimos supresión de la mutación mar en los bacteriófagos  $\lambda^*$ bio256mar4 y  $\lambda$ imm434mar1 en una cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup>, sin embargo demostramos que en esta cepa bacteriana el fragmento N7 es capaz de llevar a cabo la antiterminación de la transcripción. Con la finalidad de demostrar si lo observado por Sosa y Vaca es la supresión del fenotipo Mar y no la actividad de N7 evidenciada por nosotros, decidimos construir la cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>+</sup> y analizar en ella el comportamiento del bacteriófago  $\lambda$ N7. Para esto se crecieron los bacteriófagos;  $\lambda$ N7,  $\lambda$ I857 y  $\lambda$ imm21029 en cajas de TØ sobre un tapiz de las diferentes cepas bacterianas, las cajas se incubaron durante 1 noche a 37°C. Como un control de la actividad de los supresores bacterianos utilizados, se analizó la supresión de la proteína mutante lac am, estriándose inóculos de los cultivos bacterianos frescos en cajas de medio MacConkey lactosa. Los resultados de ambos experimentos se encuentran en la Tabla 18.

Se identificó el bacteriófago  $\lambda$ N7 como una mutante mar; no presentó crecimiento en las cepas ron<sup>-</sup>sup<sup>F</sup> y ron<sup>-</sup>sup<sup>U</sup> y sí en las cepas ron<sup>+</sup>sup<sup>F</sup> y ron<sup>+</sup>sup<sup>U</sup>. De acuerdo con Sosa y Vaca, en las cepas ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>F</sup> y ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>V</sup> el fenotipo Mar del fago  $\lambda$ N7 fue suprimido, dando lugar a la aparición de placas líticas diminutas; cabe mencionar que este crecimiento es muy similar al obtenido en una cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup>, lo que mantiene



TABLA 18. Supresión del fenotipo Mar en el bacteriófago  $\lambda$ N7.

Se analizó el comportamiento del bacteriófago  $\lambda$ N7 en las cepas ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup> y ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>+</sup>. Se observó que ambos tipos de cepas el fago presenta un crecimiento similar. Para la supresión de bacteriófago mutantes ambar; diferentes diluciones de los fagos utilizados ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) se gotearon en cajas de TØ sobre un tapiz bacteriano de las distintas cepas empleadas. Las cajas se incubaron durante 1 noche a 37°C.

(+) crecimiento del bacteriófago

(-) ausencia de crecimiento

Para la supresión de lac am; a partir de cultivos bacterianos frescos, se tomó inóculos para sembrar por estria en cajas de medio McKonkey lactosa, incubándose éstas durante 1 noche a 37°C.

(+) supresión de lac am, visto como colonias rojas en el medio indicativo

(-) ausencia de supresión de lac am, visto como colonias blancas en el medio indicativo.

TABLA 18

Cepas bacterianas	Supresión <u>lac</u> am	Supresión de Bacteriófagos		
		$\lambda$ <u>cI857</u>	$\lambda$ N7	$\lambda$ <u>imm21029</u>
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> am su <sup>o</sup>	-	+	-	-
(BCV01) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> am <u>supF</u>	+	+	+	+
(BCV11) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> am <u>supF</u>	+	+	+	+
(359) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> am su <sup>o</sup>	-	+	-	-
(BCV02) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> <sup>-</sup> <u>supF</u>	+	+	-	+
(BCV22) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>lac</u> <sup>-</sup> <u>supV</u>	+	+	-	+
(BCV21) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lac</u> <sup>-</sup> su <sup>o</sup>	-	+	+	-
(BCV03) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lac</u> <sup>-</sup> <u>supF</u>	-	+	+	+
(BCV33) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>lac</u> <sup>-</sup> <u>supV</u>	-	+	+	+

la duda en cuanto al verdadero motivo que ocasiona el crecimiento del fago  $\lambda N7$  en la cepa  $\text{ron}^- \text{lon}^- \text{sup}^+$ ; la supresión del fenotipo Mar o la actividad de N7.

En las cepas  $\text{ron}^- \text{lon}^- \text{sup}^+$  el bacteriófago mutante ambar  $\lambda \text{imm}21029$  si presentó crecimiento, lo que indica que los supresores F y U están activos. Considerando lo anterior, cuando infectamos a las cepas  $\text{ron}^- \text{lon}^- \text{sup}^F$  y  $\text{ron}^- \text{lon}^- \text{sup}^U$  con el fago  $\lambda N7$ , se produce en el sistema una proteína N completa que porta la mutación mar y no con el fragmento incompleto N7. El crecimiento del fago N7 en la cepa  $\text{ron}^- \text{lon}^- \text{sup}^+$  probablemente se deba a la estabilidad que le confiere la mutación lon a  $\text{pN}_{\text{mar}}$ , permitiéndole interaccionar con la RNA polimerasa  $\text{ron}^-$  y llevar a cabo la antiterminación de la transcripción.

Es bueno notar que en las cepas  $\text{ron}^- \text{lon}^- \text{sup}^+$  no se observó supresión de lacam, debido probablemente a que cuando construimos la cepa BCV20 se introdujo junto con la mutación proC<sup>-</sup> la mutación lacZ que no es suprimible. En las demás cepas bacterianas con supresor si se observó la supresión de lacam (colonias rojas en el medio Mac Conkey lactosa).

En conclusión la estabilidad conferida por la mutación lon a pN, logra que la interacción deficiente establecida tanto entre  $\text{pN}_{\text{mar}}$ -RNAPol  $\text{ron}^-$  como entre N7-RNAPol  $\text{ron}^-$  sea funcional para permitir la antiterminación de la transcripción. En estas circunstancias un aumento en la vida media de pN es esencial para lograr el desarrollo del bacteriófago.

XI. Efecto de la mutación lon en la N7 y Nmar3. Como se señaló previamente desarrollo que presenta el bacteriófago lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup> y lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>+</sup>. En ambos fundamentalmente a la estabilidad de lon a las formas alteradas de pN.

Se llevó a cabo un análisis de la mutación lon sobre la actividad del fago  $\lambda_{C1857}$  como control. Se midió el tamaño de las placas líticas; los resultados se muestran en la Tabla 19.

El número de u.f.p./ml que se obtuvo es similar tanto en las cepas con lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup>; sin embargo en cuanto a las placas líticas hay una notable diferencia. En las cepas lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup>, las placas son pequeñas y pocas, mientras que en las cepas lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>+</sup> las placas líticas que produce tanto como el fago control. Los resultados indican que la actividad de la proteína N en las cepas lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup> y lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> es 100% eficiente al compararlo con la actividad de la proteína N en una cepa lon<sup>+</sup>lon<sup>+</sup>.

En cuanto al comportamiento de la proteína pN; N7 y Nmar3 en las cepas lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup> y lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>+</sup> respectivamente, es indistinguible del comportamiento de la proteína pN en las cepas lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>0</sup> y lon<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>+</sup> respectivamente, es indistinguible del tamaño de las placas líticas.

TABLA 19. Efecto de la mutación lon en la actividad de las proteínas N7 y Nmar3. Se analizó la actividad de las formas alteradas de pN; N7 y Nmar3, observándose que no hay diferencia entre ambas en cuanto a su funcionabilidad para antiterminar. A partir de cultivos bacterianos frescos, se tomó 100  $\mu$  l que fueron infectados con 100  $\mu$  l de los bacteriófagos  $\lambda$  c1857 y  $\lambda$  N7; se dejó que la adsorción de los fagos ocurriera por 15 minutos, enseguida se agregó 2.5 ml de T $\emptyset$  suave y la mezcla se vertió en cajas de T $\emptyset$ . Las cajas se incubaron por una noche a 37°C. (-) Ausencia de crecimiento de los bacteriófagos.

TABLA 19

Cepas Bacterianas	$\lambda_{CI857}$		$\lambda_{N7}$	
	ufp/ml	Tamaño de placa	ufp/ml	tamaño de placa
(358) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	1.4 x 10 <sup>9</sup>	NORMAL		
(BCV21) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>sup</u> <sup>o</sup>	2.3 x 10 <sup>9</sup>	NORMAL	1.6 x 10 <sup>9</sup>	PEQUEÑA
(BCV03) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>sup</u> F	1.8 x 10 <sup>9</sup>	NORMAL	1.3 x 10 <sup>9</sup>	PEQUEÑA
(BCV33) <u>ron</u> <sup>-</sup> <u>lon</u> <sup>-</sup> <u>sup</u> U	2.0 x 10 <sup>9</sup>	NORMAL	1.6 x 10 <sup>9</sup>	PEQUEÑA
(BCV01) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>sup</u> F	3.2 x 10 <sup>9</sup>	NORMAL	2.0 x 10 <sup>9</sup>	NORMAL
(BCV11) <u>ron</u> <sup>+</sup> <u>lon</u> <sup>+</sup> <u>sup</u> U	1.6 x 10 <sup>9</sup>	NORMAL	1.7 x 10 <sup>9</sup>	NORMAL

## DISCUSION

La proteína N (pN) del bacteriófago lambda juega un papel esencial durante la antiterminación de la transcripción, mediante su interacción con la RNA polimerasa (RNAPol) impide que la enzima reconozca los sitios terminadores de la transcripción. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de pN existen evidencias experimentales que sugieren una interacción directa con la polimerasa para formar un complejo de antiterminación.

El estudio de pN se ha dificultado debido a la inestabilidad que presenta in vivo (vida media de 2-5 minutos a 35°C), se sabe que el producto bacteriano del gen lon regula negativamente su actividad, modificando su estabilidad (en mutantes lon la vida media de pN aumenta de 3 a 5 veces). Varios autores han sugerido que la estabilidad de la proteína N puede estar regulando la eficiencia de la antiterminación de la transcripción.

En el presente trabajo se analizó la influencia que tiene la estabilidad de pN en el proceso de la antiterminación de la transcripción, utilizando un ensayo in vivo, en donde se variaron las condiciones de formación del complejo RNAPol-pN. Para obtener las condiciones de mayor estabilidad para pN empleamos las mutantes bacterianas lon y con el objeto de modificar la eficiencia de formación del complejo de antiterminación se utilizó la mutante bacteriana roc. (afectada en la su-

bunidad beta de la RNA polimerasa), y bacteriófagos mutantes en pN (mar1, mar3, mar4, N7, N53). A partir de 2 cepas isogénicas, ron<sup>+</sup> y ron<sup>-</sup>, construimos las siguientes bacterias: ron<sup>+</sup>lon<sup>+</sup>, ron<sup>-</sup>lon<sup>+</sup>, ron<sup>+</sup>lon<sup>-</sup> y ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> y analizamos en ellas el desarrollo de varios bacteriófagos lambdoides.

Debido a la importancia que presentaba para este estudio la caracterización de las cepas lon, se realizaron una serie de pruebas que nos permitieron su identificación inequívoca. Las cepas donadoras de la mutación lon así como a las cepas construidas para este trabajo se caracterizaron en base a su crecimiento mucoide en medio mínimo (Tabla 6), sensibilidad a nitrofurantoína (Tablas 7 y 12), filamentación en presencia de luz ultravioleta (Tablas 8 y 13). Ghysen y Pironio (18) aislaron una mutante bacteriana llamada ron que impide el desarrollo de bacteriófagos que presentan una alteración en pN, denominada mar, estos autores reportan 5 diferentes bacteriófagos lambdoides mutantes mar (Tabla 1). Por otro lado Vaca y Sosa encontraron que en una cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>sup<sup>+</sup> el bacteriófago  $\lambda$ N7mar3 es capaz de desarrollarse (Tabla 2), en base a estos resultados, postularon que la RNA polimerasa protege a pN contra la degradación de la proteasa Lon, por esta razón cuando el complejo de antiterminación se encuentra alterado (RNapol-ron<sup>-</sup>-pNmar) la interacción es más débil y el ataque proteolítico sobre pN es mayor al grado que se inhibe el desarrollo del fago. Asimismo cuando se encuentra ausente



la proteasa Lon, este complejo modificado es capaz de llevar a cabo la antiterminación de la transcripción. Estos mismos resultados les sugirieron que un aumento en la vida media de pN permite que una interacción deficiente entre la polimerasa y pN sea funcional.

Nosotros decidimos reproducir los resultados anteriores pero debido a que las cepas ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> construidas en este trabajo carecían de un supresor de mutaciones ámbar, no fue posible analizar en ellas el desarrollo del bacteriófago  $\lambda$ N7mar3, por lo cual decidimos utilizar los bacteriófagos  $\lambda$ bio256mar4 y  $\lambda$ inm434mar1 (que no presentan mutaciones ámbar) para analizar la supresión del fenotipo Mar en las cepas ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>. En este trabajo se demostró que los bacteriófagos  $\lambda$ inm434mar1 y  $\lambda$ bio256mar4 (Tabla 14) no se desarrollaron en las cepas ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup>, estos resultados están en desacuerdo con la idea de que en una cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> el fenotipo Mar es suprimido. Sin embargo, los experimentos de Sosa y Vaca en donde se observó supresión del fenotipo Mar, se realizaron en mutantes  $\lambda$ N7mar3 cuyo comportamiento podría ser diferente al de las otras mutaciones mar.

Con los resultados anteriores fue posible concluir que una vida media mayor de pN no logra suprimir una interacción deficiente entre la RNA polimerasa y la proteína N de los bacteriófagos  $\lambda$ inm434 y  $\lambda$ bio256mar4. La mutación mar que portan estos bacteriófagos en la proteína N pasa desapercibida en

las cepas  $\text{ron}^+$ , en donde la formación del complejo  $\text{pNmar-RNA}$  polimerasa es funcional (18).

Al analizar el desarrollo de bacteriófagos con la mutación ámbar N7 en la cepa  $\text{ron}^- \text{lon}^- \text{sup}^0$  (Tabla 16), se observó que este fago es capaz de crecer, resultado que sugiere que el fragmento N7 (aproximadamente 70% de la proteína silvestre) es capaz de antiterminar. Sorprendentemente este fenómeno solamente se presentó en la cepa  $\text{ron}^- \text{lon}^-$  mientras que en la cepa  $\text{ron}^+ \text{lon}^-$  no se encontró crecimiento. De alguna manera la configuración tridimensional que adopta la proteína N7 y la polimerasa  $\text{ron}^-$  favorece su interacción; el complejo que se forma en estas condiciones es incapaz de antiterminar en condiciones normales, no obstante en un sistema donde la estabilidad de pN es mayor esta deficiencia es superada. Considerando este resultado es posible que el efecto observado por Vaca y Sosa en cuanto al crecimiento del fago  $\lambda\text{N7mar3}$  en una cepa  $\text{ron}^- \text{lon}^- \text{sup}^+$  podría reflejar la actividad de N7 y no la supresión del fenotipo Mar. Con la intención de comprender este fenómeno se introdujo a las cepas  $\text{ron}^- \text{lon}^-$  supresores de mutaciones ámbar y se analizó en ellas el crecimiento del fago  $\lambda\text{N7mar3}$  (Tabla 18) y se encontró, de acuerdo con Vaca y Sosa que el fenotipo Mar es suprimido y este fago es capaz de crecer en la bacteria mencionada. Cuando comparamos la actividad antiterminadora de N7 y Nmar3 (Tabla 19) encontramos que por el método utilizado no es posible detectar diferencias en el

desarrollo de ambos fagos, tanto por el número de ufp/ml, como por el tamaño de la placa lítica obtenida, en ambos casos son placas pequeñas. Sin embargo nuestros datos sugieren que se trata de 2 fenómenos distintos, en un caso la actividad de antiterminación se debe al fragmento N7 y en el otro a la proteína completa Nmar. Una manera directa de comprobar lo anterior, sería detectando las proteínas sintetizadas en geles de poliacrilamida en condiciones lon<sup>+</sup> y lon<sup>-</sup>. Posterior a esto se podría concluir sobre sí una mayor estabilidad de pN logra suprimir parcialmente la interacción deficiente entre la RNA polimerasa y N7 ó Nmar3.

Nuestros resultados sugieren que para que se lleve a cabo la antiterminación de la transcripción, es necesario no solo la eficiente interacción entre pN y la polimerasa sino además la estabilidad de la proteína antiterminadora, en este trabajo se evidenció la importancia de la proteasa lon en la formación del complejo de antiterminación.

En relación al modelo propuesto por Vaca y Sosa es necesario evaluarlo mediante experimentos más directos como sería midiendo la vida media de pN mediante su desaparición en geles de poliacrilamida, utilizando las cepas construidas en este trabajo. De acuerdo al modelo se esperaría que en presencia de pLon, en la cepa ron, pN tuviera una vida media menor en relación a la cepa ron<sup>+</sup>.

El porque la mutación lon<sup>-</sup> solamente suprime a la mutante mar3 y no a mar1 y mar4, se puede explicar considerando que estas dos últimas mutaciones se localizan en un lugar distinto a mar3 dentro del gen N, quizá en una región esencial para la interacción de pN con la polimerasa (Figura 2). Esto podría ocasionar que a pesar de existir pN en el sistema no forma el complejo antiterminador con la polimerasa.

Las mutantes mar1 y mar4 se han localizado en la misma región (18) del gen N por experimentos de mapeo, y considerando su comportamiento similar en la cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> es posible que se trate de la misma mutación, aunque para comprobarlo sería necesario realizar la secuenciación de las mismas. Asimismo sería interesante probar el comportamiento de la mutante mar2 y mar5 que no se utilizaron en este trabajo.

Alternativamente para evaluar la importancia de la estabilidad de pN durante la antiterminación de la transcripción, utilizamos un sistema donde el desarrollo del fago fuera más dependiente de pN, para lo cual utilizamos un fago que lleva la inserción r32 que consiste de un terminador sensitivo a pN (Tabla 15). En este sistema la presencia de la mutación ron<sup>-</sup> provoca una baja en el desarrollo de partículas fágicas evidenciando por el tamaño pequeño de las placas líticas producidas (en relación a la cepa ron<sup>+</sup>). Sin embargo, contrario a lo esperado en la cepa ron<sup>-</sup>lon<sup>-</sup> el desarrollo del fago siguió siendo bajo a pesar de existir mayor cantidad de pN en el sistema.

Al menos en este sistema un aumento en la estabilidad de pN no se reflejó en una mayor eficiencia en la antiterminación de la transcripción.

CONCLUSIONES

- 1) El fragmento de la proteína N producido por la mutación N7 es capaz de llevar a cabo la antiterminación de la transcripción en ausencia de la proteasa Lon.
- 2) La mutación lon suprime a la mutación mar3, pero no las mutaciones mar1 y mar4.
- 3) Los resultados sugieren que durante la antiterminación de la transcripción es necesario tanto una interacción eficiente entre la RNA polimerasa y pN como cantidades suficientes de la proteína antiterminadora en el sistema.

BIBLIOGRAFIA

1. Adhya, S., and Gottesman, M. (1978) Control of transcription termination. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 967-974.
2. Adler, H., and Hardigree, A. (1965). Growth and division of filamentous forms of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology.* 90 No. 1, 223-226.
3. Aneuski, P., and Lozeron, H. (1981). Multiple pathways of RNA processing and decay for the mayor leftward N-independent RNA transcript of coliphage lambda. *Virology* 113, 39-53.
4. Baumann, M., and Friedman, D. (1976). Cooperative effects of bacterial mutations affecting lambda Ngene expression. *Virology* 73, 119-127.
5. Baumann, M., and Friedman, D. (1976). Cooperative effects of bacterial mutations affecting lambda Ngene expression. *Virology* 73, 128-138.
6. Benoit, de C., Mudryj, M., DiLauro, R., and Gottesman, M. (1979). Specificity of the bacteriophage lambda Ngene product (pN): Nut sequences are necessary and sufficient for antitermination by pN. *Cell* 18, 1145-1151.
7. Das, A., and Wolska, K. (1984). Transcription antermination in vitro by lambda Ngene product: requeriment for a phage nut site and the product of host nusA, nusB, and

nusE. Genes Cell 38, 165-173.

8. Douglas, F., Ward, I., and Gottesman, E. (1981). The nus mutations affect transcription termination in Escherichia coli. Nature 292, 212-217.
9. Epp, C., and Pearson, M. (1976). Association of bacteriophage lambda N gene protein with E.coli RNA polymerase in RNA polymerase. edit. by Losick, R. and Chamberlin, M. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A. 667-691.
10. Franklin, N. (1974). Altered reading of genetic signal fused the N operon of bacteriophage . genetic evidence for modification of polymerase by the protein product of the N gene. J. Mol. Biol. 89, 33-48.
11. Franklin, N. (1985). Conservation of genome form but no sequence in the transcription antitermination determinants of bacteriophages  $\lambda$ ,  $\phi$  21, and P22. J. Mol. Biol. 181, 75-84.
12. Franklin, N. (1985). "N" transcription antitermination proteins of bacteriophage  $\lambda$ ,  $\phi$  21, and P22. J. Mol. Biol. 181, 85-91.
13. Franklin, N., and Bennett, C. (1979). The protein of bacteriophage lambda, defined by its DNA sequence, is highly basic. Gene 8, 107-112.



14. Friedman, D., and Baron, L. (1974). Genetic characterization of a bacterial locus involved in the activity of the N function of phage lambda. *Virology* 58, 141-149.
15. Friedman, D., and Gottesman, M. (1983), Lytic Mode of development in lambda II (Hendrix, R., Roberts, J., Stahi, F. and Weisberg, R. eds) 24 Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor New York. 21-52.
16. Friedman, A., Schaver, M., Bauman, L., and Adhya, S. (1981). Evidence that ribosomal protein S10 participates in the control of transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 1115-1129.
17. Georgopoulos, C. P. (1971). Bacterial mutants in which the geneN function of bacteriophage lambda is blocked have and altered RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 2977-2981.
18. Ghysen, A., and Pironio, M. (1972). Relationship between the N function of bacteriophage lambda and host RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 65, 259-272.
19. Gottesman, M., Adhya, S., and Das, A. (1980). Transcription antitermination by bacteriophage lambda N gene product. *J. Mol. Biol.* 140, 57-75.
20. Gottesman, S., Gottesman, M., Show, J., and Pearson, M. (1981). Protein degradation in E.coli: The lon mutation and bacteriophage lambda N and cII protein stability.

Cell 24, 225-233.

21. Gottesman, S., and Zipser, D. (1978). Deg phenotype of Escherichia coli lon mutants. Journal of Bacteriology 133 No. 2, 844-851.
22. Greenblatt, J. (1973). Regulation of the expression of the N gene of bacteriophage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 421-424.
23. Greenblatt, J. (1981). Regulation of transcription termination by the N gene protein of bacteriophage lambda. Cell 24, 8-9.
24. Greenblatt, J. (1983). Regulation of transcription termination in E.coli. CAN. J. Biochem. Cell. Biol. 62, 79-88.
25. Greenblatt, J., and Goda, Y. (1985). Efficient modification of E.coli RNA polymerase in vitro by the N gene transcription antitermination protein of bacteriophage lambda. Nucleic Acids Research. 13 No. 7, 2569-2582.
26. Greenblatt, J., and Joyce Li (1982). Properties of the N gene transcription antitermination protein of bacteriophage . The Journal of Biological Chemistry 257 No. 1, 362-365.
27. Greenblatt, J., Joyceli Li, Sankar, A., Friedman, D., and Baron, L. (1980). L factor that is required for B-

- galactosidase synthesis is the nusA gene product involved in transcription termination. Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1991-1994.
28. Greenblatt, J., and Li, J. (1980). Purification of the gene N transcription anti-termination protein of bacteriophage  $\lambda$ . J. Biol. Chem. 255, 1465-1470.
  29. Crossman, A., Burgess, R., Walter, W., and Gross, C. (1983). Mutations in the lon gene of E.coli K12 phenotypically suppress a mutation in the sigma subunit of RNA polymerase. Cell 32, 151-159.
  30. Heil, A., and Zilling, W. (1970). Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. FEBS Lett. 11, 165-168.
  31. Hippel, P., Bear, D., Morgan, W., and Mc Siwiggen, J. (1984). Protein-nucleic acid interactions in transcription. Ann. Rev. Biochem. 53, 389-446.
  32. Howard-Flanders, P. and Simson, E. (1964). A locus that controls filament formation and sensitivity to radiation in E.coli K12. Genetics 49, 237-246.
  33. Huas, S., and Morkovitz, A. (1972). Multiple regulatory gene control of the galactose operon in E.coli K12. Journal of Bacteriology 110, 1089-1099.

34. Ishii, S. Kuroki, K., Sugino, Y. and Imanoto, F. (1980). Purification and characterization of the N gene product of bacteriophage lambda. *Gene* 10, 291-300.
35. Ishii, S., Salstrom, J. and Sugino, Y. (1980). A biochemical assay for the transcription-antitermination function of the coliphage N gene product. *Gene* 10, 17-25.
36. Keppel, F., Georgopoulos, C. and Eisen, H. (1974). Host interference with expression of the lambda N gene product. *Biochemic.* 56, 1503-1515.
37. Kirby, E. Ruff, W. and Goldthwait, D. (1972). Cell division and prophage induction in E.coli effects of pantoyl lactone and various furan derivated. *Journal of Bacteriology* 111, 447-453.
38. Lecocq, J., and Dambly, C. (1976). A bacterial RNA polymerase mutant that render growth independent of the N and cro functions at 42°C. *Molec. gen Genet.* 145, 53-64.
39. Lewin, B. (1985) *Genes* 2<sup>a</sup> ed. Wiley and Sons. U.S.A.
40. Li, S., Squires, L. and Squires, C. (1984). Antitermination E.coli rRNA transcription is caused by a control region segment, containing lambda nut-like sequences. *Cell* 38, 851-860.
41. Luria, S., Darnell, Jr., Baltimore, D. and Campeell, A. (1978). *General Virology* 3<sup>a</sup> ed. John Wiley and Sons U.S.A.

42. Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, S. (1982). Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor U.S.A.
43. Miller, H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor U.S.A.
44. Morgan, E., Holben, W. and Prasad, S. (1985). Antitermination by both the promoter and the leader regions of an E.coli ribosomal RNA operon. Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 5073-5077.
45. Nakamura, Y., Kurihara, T. and Saito, H. (1979). Sigma subunidad of E.coli RNA polymerase affects the function of N gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4593-4597.
46. Olson, E., Flamm, E. and Friedman, D. (1982). Analysis of nutR: A region of phage lambda required for antitermination of transcription. Cell 31, 61-70.
47. Radding, C. and Echols, H. (1968). J. Mol. Biol. 170: 50-55.
48. Raftery, L., Egan, J., Clines, S. and Yarus, M. (1984). Defined set of cloned termination suppressors: in vivo activity of isogenetic UAG, UAA and UGA suppressor tRNAs. Journal of Bacteriology. 158 No. 3, 849-859.
49. Roberts, S. (1969). Terminator factor for RNA synthesis. Nature 224, 1168-1175.
50. Rosenberg, M. Court, D., Shimatake, H., Brady, C. and

- Wulff, D. (1978). The relationship between function and DNA region in phage  $\lambda$ . *Nature* 272, 414-420.
51. Salstrom, J. and Szybalski, W. (1978). Coliphage  $\lambda$  nutL. a unique class of mutants defective in the site of geneN product utilization for antitermination of leftward transcription. *J. Mol. Biol.* 124, 195-221.
52. Schoemaker, J., Gayda, R. and Markovitz, A. (1984). Regulation of cell division in E.coli: SOS induction and cellular location of the Sula protein, a key to lon-associated filamentation and death. *Journal of Bacteriology* 158 No. 2, 551-561.
53. Shaw, J., Jones, B. and Pearson, M. (1978). Identification of the Ngene protein of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75 No. 5, 2225-2229.
54. Simon, L., Gottesman, M., Tomezak, K. and Gottesman, S. (1979). Hyperdegradation of protein E.coli rho mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1623-1630.
55. Tsugawa, A., Kurihara, T. and Zuber, M. (1985). E.coli NusA protein binds in vitro to an RNA sequence immediately upstream of the box A signal of bacteriophage lambda. *The EMBO Journal* 4, 2337-2342.
56. Warren, F., and Das, A. (1984). Formation of termination-resistant transcription complex at phage nut locus. Effects of altered translation and a ribosomal mutation.

Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3612-3616.

57. Appleyard, R. L. (1954). Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from E.coli K-12. Genetics 39, 440-448.
58. Brachet, P., Eisen, H. and Rambach. (1970). A mutations of coliphage affecting the expression of replicative functions O and P. Molec. gen Genet. 108, 266-276.
59. Campbell, A. (1961). Sensitive mutants of bacteriophage . Virology 14, 22-32.
60. Kaiser, A. D. and Jacob, F. (1957). Recombination between related temperate bacteriophages and the genetic control of immunity and prophage localization. Virology 4, 509-521.
61. Sussman, R. and Jacob, F. (1962). Surun systeme de repression thermosensible chez le bactériophagé d'E.coli. Compt. Rend. Acad. Sci. 254, 1517-1519.