



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

AISLAMIENTO DE MUTANTES SOBREVIVIENTES
 AL PLASMIDO PORTADOR DEL GENE c II DEL
 BACTERIOFAGO LAMBDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JAYA LEA LILIAN PORTNOY GRUNBERG

MEXICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORA-
TORIO DEL DR. GABRIEL GUARNEROS, EN EL DEPAR-
TAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL
CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZA-
DOS DEL I.P.N.

DEDICATORIA:

A MIS PADRES: Por su amor y educación

A JANE YOSI y ENRIQUE: Por este cariño
de hermanos.

A esas chispitas: EDUARDO y ALEJANDRO

AGRADEZCO:

Al Dr. Gabriel Guarneros por las enseñanzas recibidas.

A la M.C. Alison Rattray de quien nació la idea de este trabajo y me dirigió en un principio.

Al Dr. Max Gottesman por el estímulo y facilidades recibidas para la última parte del trabajo que se realizó en su laboratorio en los Institutos Nacionales de Salud en Bethesda, Maryland.

Al M.C. Sergio Vaca por el apoyo incondicional
en estos años.

A la Dra. Cecilia Montañez por la paciente
revisión.

A la Sra. Rebeca Barrera por mecanografiar
esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio y en especial
a José Manuel por las figuras del trabajo.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIALES Y METODOS.....	21
Cepas bacterianas.....	21
Plásmidos.....	21
Soluciones y medios de cultivo.....	21
Método para cuantificar el efecto letal del plásmido pOG7.....	25
Técnica de cuenta viable.....	25
Método de mutagénesis con nitroso-guanidina.....	26
Método de selección de mutantes sobrevivientes a la proteína cII.....	26
Método para cuantificar β -Galactosidasa.....	27
Método de curación de plásmido.....	28
Método de extracción rápida de DNA de plásmido....	28
Método de transformación.....	29
Método de estimación de β -Lactamasa extracelular..	30
Método de detección de represor λ cI, λ <u>imm</u> 21, λ <u>imm</u> 434 en las cepas bacterianas.....	30
Método para preparar geles de agarosa (1%).....	30
Método de incorporación de (³⁵ S)metionina.....	31
RESULTADOS.....	32
Cuantificación del efecto letal del plásmido pOG7.	32
Aislamiento de mutantes.....	32

Localización de las mutaciones.....	37
Actividad de la proteína cII en las mutantes....	45
Estimación de β -Lactamasa extracelular.....	61
Detección del represor λ cI en las cepas mutantes.	61
Análisis de proteínas bacterianas por incorpora- ción de (35 S)metionina.....	69
DISCUSION.....	74
CONCLUSION.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	81

RESUMEN

El bacteriófago lambda es temperado y como tal puede seguir el ciclo lítico o el lisogénico. Para el establecimiento de la lisogenia se requieren de los productos fágicos cI e Int, regulados ambos por la proteína cII de lambda.

En 1981, Shimatake y Rosenberg reportaron que la proteína cII era letal en células inducidas para un plásmido que lleva el gene cII. Rattray y colaboradores observaron que la estabilidad de la proteína cII aumentaba a tiempos largos de inducción y que existía inhibición en la síntesis de proteínas bacterianas.

Nos interesó estudiar este efecto letal utilizando un plásmido portador de una región de lambda que incluía al gene cII y al promotor p_L sujeto a desrepresión a alta temperatura. En este estudio se cuantificó la letalidad debida al plásmido que fué estimulada por la proteína N de lambda. Se procedió a aislar mutantes bacterianas (en presencia y ausencia de la proteína N) sobrevivientes a la desrepresión por tratamiento con nitroso-guanidina y se caracterizaron.

1. En presencia de la proteína N de lambda (N⁺/cII⁺).
 - 1.1. La mutación que confiere resistencia a la proteína cII se localizó en el genoma bacteriano.
 - 1.2. La producción de la enzima β-Galactosidasa, dependiente de la proteína cII, en las mutantes fué de 4 veces menos que en la cepa silvestre. .
 - 1.3. Las cepas mutantes no produjeron proteína cII al analizarse en geles de poliacrilamida-SDS.

- 1.4. Por pruebas de inmunidad se encontró que el profago λ_{cI} de las cepas mutantes es termoestable impidiendo la expresión del gene cII y por lo tanto inhibiendo el efecto letal.

2. En ausencia de la proteína N de lambda (N^-/cII^+).
 - 2.1. La mutación se localizó en el plásmido.
 - 2.2. La producción de la enzima β -Galactosidasa, dependiente de la proteína cII , es similar a ambas temperaturas, mientras que en la cepa silvestre, la producción de enzima a 42°C es 4 veces mayor que a 32°C .
 - 2.3 Por pruebas de inmunidad se concluyó que el represor λ_{cI} del profago mantenía su carácter de termosensibilidad.
 - 2.4 Analizando el patrón de proteínas en las cepas mutantes se observó la presencia de la proteína cII a tiempos tardíos y no se detectó inhibición en la síntesis de proteínas bacterianas.

INTRODUCCION

A pesar de la gran cantidad de información génica contenida en los organismos vivos, solo una pequeña cantidad de esta información es expresada respondiendo a estímulos medio ambientales que permiten a su vez la expresión de ciertos genes y la represión de otros. Se han empleado bacterias y virus como modelos de estudio para tratar de comprender estos mecanismos de regulación de la expresión genética.

Dentro del grupo de los virus existen algunos cuyos huéspedes son bacterias (bacteriófagos) los cuales son partículas con una molécula de ácido nucleico recubierta de proteínas capaces de replicarse al infectar con su ácido nucleico a las células huésped y utilizar la maquinaria de síntesis celular para la formación de nuevas partículas.

Morfología del bacteriófago lambda.

El bacteriófago lambda está formado por una molécula de DNA de doble cadena con peso de 36×10^6 daltones (48,000 pares de bases) (Fiandt *et al.*, 1977) encapsulada en una cabeza icosaédrica de 0.05 μm de diámetro y una cola tubular de 0.15 μm de largo (Lewin, 1977). La relación DNA: proteína es de 1:1. Su DNA codifica para 50 proteínas (Szybalskiy Szybalski, 1979) y presenta en cada uno de sus extremos una región de cadena sencilla de 12 bases complementarias entre sí que le permite al genoma circularizarse en el interior de la célula (Yarmolinsky, 1971).

Ciclo de vida:

Cuando el bacteriófago lambda infecta a una bacteria de E. coli puede seguir cualquiera de los procesos mutuamente excluyentes conocidos como lisis y lisogenia (Figura 1). El ciclo lítico conduce a la muerte celular y a la liberación de alrededor de 100 fagos por célula infectada. En el ciclo lisogénico, el bacteriófago lambda es capaz de coexistir en armonía con su huésped dirigiendo la síntesis de la proteína que promueve la integración (Int, producto del gene int) de su DNA en el genoma bacteriano, así como la síntesis de un represor (cI, producto del gene cI) que inhibe la expresión de la mayor parte de los genes virales, evitándose la muerte celular y la liberación de progenie. Una vez decidido el modo de crecimiento que se adoptará, se debe seguir una secuencia de expresión génica coordinada con genes tempranos, medios y tardíos y suprimir las funciones que interfieran con este desarrollo. Por ejemplo: En el ciclo lítico la replicación precede al empaquetamiento y el último evento será la lisis celular, mientras que en el ciclo lisogénico el crecimiento lítico debe inhibirse o la célula infectada moriría (Herskowitz y Hagen, 1980; Friedman y Gottesman, Bacteriophage Lambda).

Durante la fase lisogénica, el DNA viral se integra al genoma bacteriano formando un cromosoma continuo que se replica como parte del genoma del huésped (Campbell, 1976; Sharp et al., 1972) y reprime la expresión de la mayor parte de los genes virales. La bacteria que se encuentra en este estado se conoce como lisógena y el DNA viral integrado como profago

(Weisberg, 1977). De esta manera, las células provenientes de una célula lisógena seguirá siendo centros potenciales para la producción de partículas fágicas porque el profago puede ser inducido al ciclo lítico por agentes químicos que dañan el DNA, (por ejemplo: mitomicina C) por la acción de la luz ultravioleta (Roberts y Roberts, 1975) o a muy baja frecuencia, de forma espontánea. El proceso de inducción también puede ocurrir cuando el profago posea un represor termosensible (cI857) que a alta temperatura (39°C-42°C) se desnaturaliza eliminándose la represión de las funciones virales, (Sussman y Jacob, 1962).

En una bacteria lisógena, el único producto viral presente es el represor, que además de apagar los operones virales, le confiere inmunidad a la lisógena, impidiendo que sea infectada por fagos de la misma inmunidad (Lwoff y Guttman, 1950).

Transcripción del genoma viral.

En el genoma de lambda, los genes se encuentran distribuidos dependiendo de su función en 5 regiones: (Figura 2) (Friedman y Gottesman, Bacteriophage Lambda).

1. Morfogénesis: Genes A-J que codifican para las proteínas de cabeza y cola necesarias para el empaquetamiento.
2. Recombinación: Para que se integre el DNA viral se requiere de la proteína Int más algunas proteínas bacterianas y para catalizar la escisión del genoma viral, se requiere de Int y Xis y algunas proteínas del huésped.

3. Regulación: De las 50 proteínas fágicas, 6 de ellas (cI, cII, cIII, N, cro y Q) regulan la expresión génica para tomar y llevar a cabo la desición del modo de crecimiento, ya sea lítico o lisogénico.
4. Replicación: Las proteínas (O y P) y el sitio (ori) necesarios para la iniciación de la replicación del DNA viral.
5. Lisis: S y R son las proteínas líticas de membrana y pared celular respectivamente necesarias para el último paso en el ciclo lítico.

Después de que el DNA viral ha sido inyectado se circulariza y la RNA polimerasa bacteriana se une a los promotores tempranos iniciándose la transcripción hacia la izquierda y derecha (a partir de p_L y p_R respectivamente) (Figura 3).

La transcripción iniciada en p_L se detiene en el terminador t_L produciendo un mensajero de 12S que al ser traducido da origen a la proteína N (Franklin y Bennett, 1979). La función de la proteína N es de antiterminación permitiéndole a la RNA polimerasa transcender las señales de terminación t_L y t_R (Roberts, 1969). Para que N actúe se necesita de un sitio de reconocimiento en el DNA viral llamado nut_L que se localiza a la derecha de N dentro del operón p_L (Salstrom y Szybalski, 1978) y se localiza un sitio nut_R dentro del operón p_R (Rosenberg *et al.*, 1978) entre cro y t_R (Figura 3).

La transcripción de p_L modificada por la proteína N se sigue hasta la región b_2 y la transcripción de p_R modificada por la proteína N llega hasta el gene Q. La transcripción de los

demás genes, se inicia en p_R (adyacente a Q) (Figura 3); y la proteína Q actúa como antiterminador de manera similar a la proteína N permitiendo la elongación del mensaje más allá de t_R (Herskowitz y Hagen, 1980).

Represión.

El represor cI es transcrito a partir de los promotores p_{RE} (promotor que establece la represión) y p_{RM} (promotor que mantiene la represión) que funciona a diferente momento durante el estado lisogénico. A tiempos tempranos de la infección, las primeras moléculas del represor que se sintetizan provienen del promotor p_{RE} que se localiza en la región \underline{y} de lambda (Figura 4) cercano al gene cII . Este promotor está regulado positivamente por la proteína cII y es el que establece la represión (Reichart y Kaiser, 1971, Echols y Grenn, 1971). El promotor p_{RM} se localiza adyacente a cI y es regulado negativamente por el mismo represor cuando se encuentra a altas concentraciones, mientras que a bajas concentraciones, cI estimula su propia síntesis, siendo el responsable del mantenimiento de la represión (Figura 4) (Ptashne, A. et al., 1980).

El represor actúa a nivel de los operadores tempranos izquierdo y derecho (o_L y o_R respectivamente) reprimiendo la expresión de los genes virales a partir de los promotores p_L y p_R (Figura 4).

Integración y Escisión:

La integrasa (producto de int) al igual que cI puede ser transcrita a partir de 2 promotores: Un promotor distal (p_L)

en presencia de la proteína N y un promotor proximal al gene int (p_I) que está regulado positivamente por la proteína cII (Salstrom y Szybalski, 1978) (Figura 4).

La proteína Int cataliza la recombinación sitio específica entre el sitio att de lambda (PoP') y el de la bacteria (BoB') formando un cromosoma único (Miller, H.I. y Friedman, D.I. 1980) (Figura 5).

El gene xis es transcrito a partir de p_L en presencia de la proteína N. Y para catalizar la escisión del DNA viral, actúan las proteínas Int y Xis junto con algunas proteínas bacterianas. (Figura 5) (Herskowitz y Hagen, 1980) (Gottesman y Abremski, 1980).

Activación por la proteína cII:

La proteína cII regula la transcripción del represor cI (del promotor p_{RE}) y de int (por p_I) en la respuesta lisogénica y actúa como elemento determinante controlando el balance entre el desarrollo lítico y lisogénico (Wulff y Rosenberg, Bacteriophage Lambda).

Experimentos in vitro en presencia de la proteína cII con templados de DNA y RNA polimerasa demostraron que la proteína cII era necesaria para la transcripción de ambos promotores fágicos y la afinidad de la proteína por el DNA de ambos promotores era la misma (Shimatake y Rosenberg, 1981; Ho y Rosenberg, 1982). Estudios de protección contra DNasas sugirieron que la proteína cII interactúa específicamente en la región -35 de ambos promotores y que la RNA polimerasa sola no interactúa con los promotores, sino que requiere de la proteína cII para que ésta proteja toda la región del promotor.

Sin embargo, la eficiencia de transcripción del promotor P_{RE} es 4 veces mayor que la del promotor P_I . Ambos promotores muestran en la región de -35 una homología de 11 de 14 pares de bases, mientras que en la región de -10, la homología es menor (Figura 6). Otra diferencia es que P_{RE} inicia con ATP y P_I , con UTP. Explicándose la eficiencia de transcripción de estos promotores por una habilidad diferencial de la RNA polimerasa debido a las diferencias de los promotores (Ho y Rosenberg, 1982; Wulff et al., 1980).

Efecto letal de la proteína cII:

Shimatake y Rosenberg, en 1981 construyeron un plásmido multicopia pKC30-cII (Figura 7) portador de una región del bacteriófago lambda que incluye al gene cII , la expresión de este gene está bajo la regulación del promotor P_L . Al intentar transformar con este plásmido cepas no lisógenas para lambda, no fué posible obtener transformantes. Esto fué posible solamente en cepas lisógenas para lambda capaces de reprimir la expresión de P_L . Los autores sugirieron que la expresión aumentada del gene cII (alcanza el 5% de las proteínas celulares) era letal para la bacteria huésped.

Complementando esto, Rattray y colaboradores, utilizaron cepas lisógenas con un profago críptico termoinducible y portador del plásmido pOG7 (P_L -cII) (Figura 9) encontraron que las proteínas sintetizadas en presencia de (^{35}S)metionina y analizadas en geles de poliacrilamida-SDS presentaban las siguientes características:

- i La proteína cII se estabilizaba a medida que aumentaba el tiempo de incubación a 42°C. Habiendo sido reportado que cII era inestable (Belfort y Wulff, 1974; Jones y Herskowitz, 1978).
- ii Las bandas correspondientes a las proteínas bacterianas disminuían de intensidad, en experimentos de pulso y caza, hasta que finalmente no se detectaban (Figura 8).

Con el propósito de entender la función de la proteína cII en relación con la expresión génica de las proteínas bacterinas, decidimos aislar mutantes resistentes al efecto letal del plásmido, y caracterizarlas genética y funcionalmente y tratar de postular un modelo que explique este comportamiento.

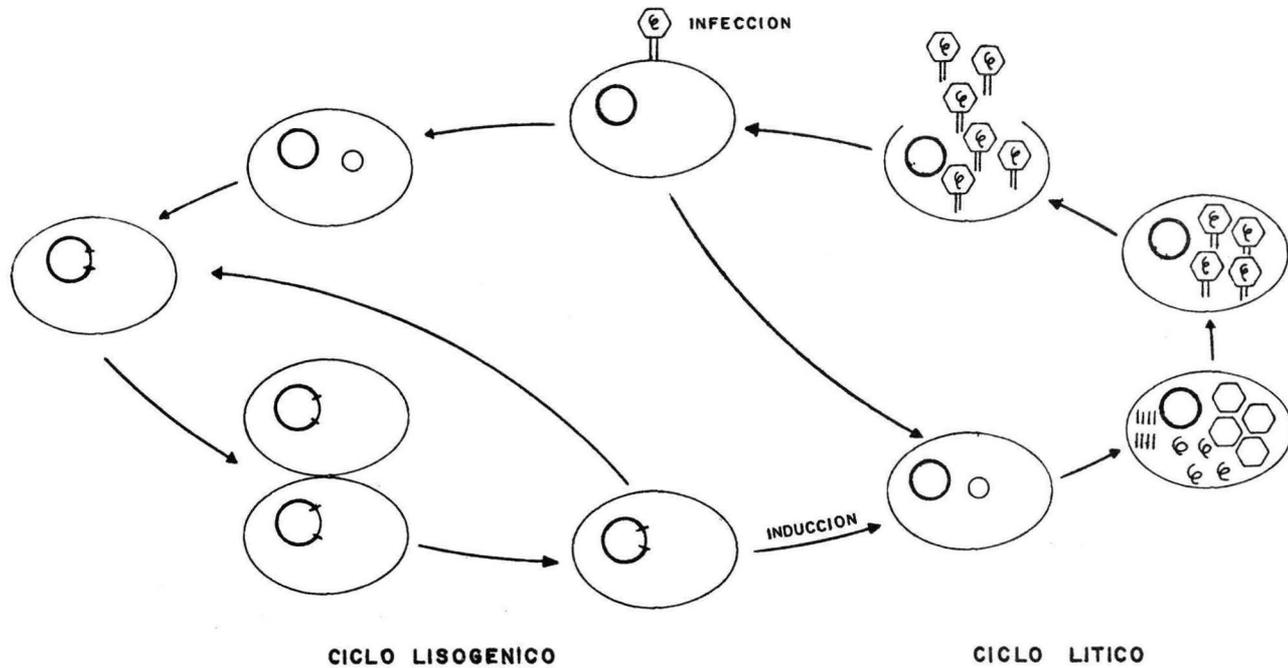


Figura 1. Vías de desarrollo del bacteriófago Lambda.

Después de que el bacteriófago infecta con su DNA a su huésped (E. coli) puede seguir el ciclo lítico que conduce a la muerte celular y a la liberación de alrededor de 100 bacteriófagos por célula infectada, o bien, el ciclo lisogénico donde el DNA viral se integra al genoma bacteriano y reprime la expresión de la mayoría de sus genes coexistiendo en armonía con su huésped. Se puede inducir al ciclo lítico cuando se inactiva el represor y se escinde el DNA viral. (Lewin, 1977).

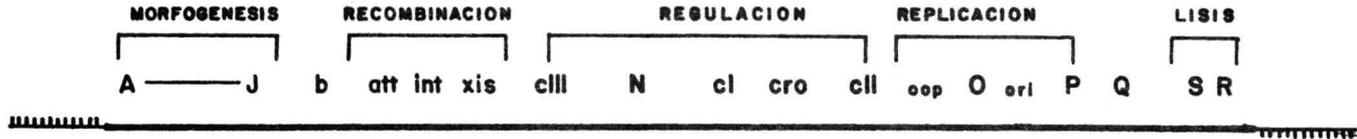


Figura 2. Genoma del bacteriófago lambda.

Los genes se encuentran distribuidos dependiendo de su función en 5 regiones. Cada extremo de la molécula presenta una región de cadena sencilla de 12 nucleótidos complementarios entre sí, que permiten la circularización del DNA viral una vez dentro de la célula huésped (Friedman y Gottesman, Bacteriophage lambda).

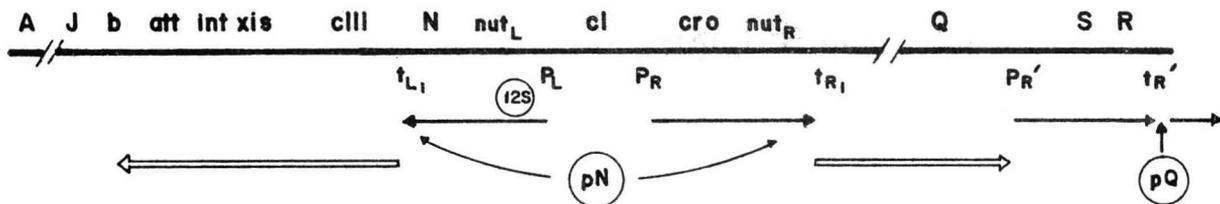


Figura 3. Transcripción del genoma del bacteriófago lambda.

La transcripción se inicia en los promotores tempranos P_L y P_R . El mensajero 12S de P_L codifica para la proteína N (pN) cuya función es de antiterminación al unirse en los sitios nut_L y nut_R y así permite a la RNA polimerasa seguir transcribiendo (flechas blancas). El mensaje de P_L llega hasta la región b y el de P_R , hasta el gene Q . En el ciclo lítico la transcripción tardía es a partir de P_R , transcribiendo los genes R , S y de A a J en el genoma circularizado, pues pQ actúa como antiterminador a nivel de t_R (Herskowitz y Hagen, 1980).

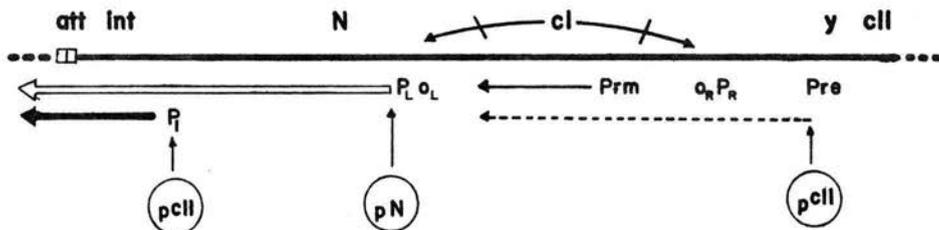


Figura 4. Transcripción de los genes cI e int de lambda.

El represor cI es transcrito a partir de los promotores P_{RE} y P_{RM} . P_{RE} se localiza en la región y y es activado por la proteína CII (pCII) y P_{RE} , cercano a cI es regulado por el represor. El represor reprime a los promotores tempranos uniéndose a O_L y O_R .

La integrasa (Int) se transcribe a partir de un promotor distal (P_L) cuando actúa la proteína N (pN) y a partir del promotor proximal (P_L) regulado por pCII (Oppenheim & Oppenheim, 1978).

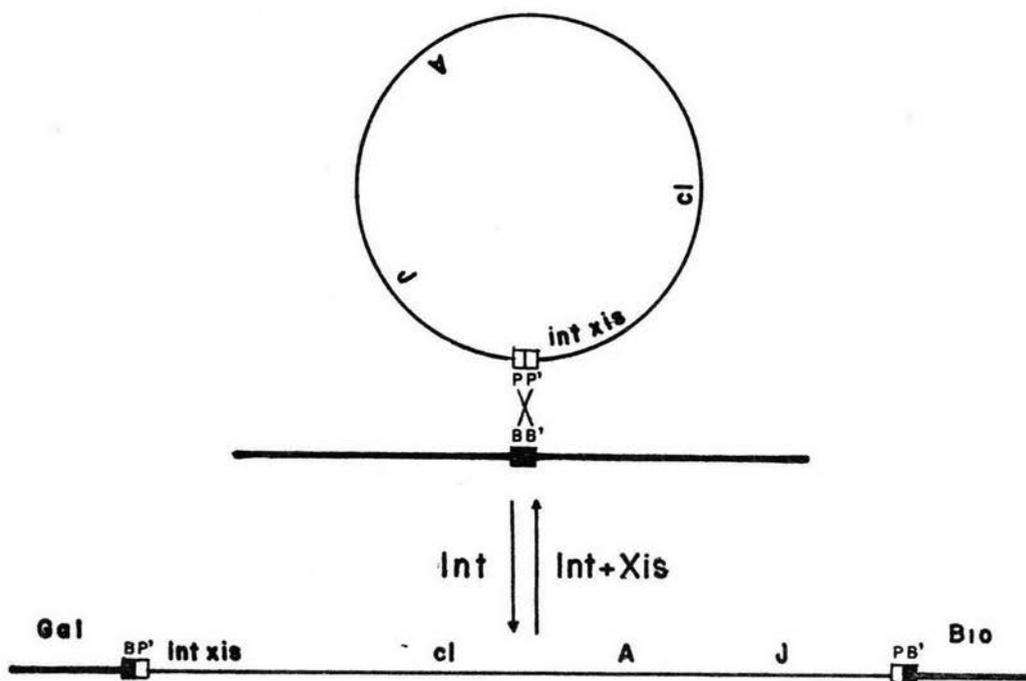


Figura 5. Diagrama de la recombinación sitio específica entre el DNA viral circularizado y el genoma bacteriano.

Para que se lleve a cabo la integración se requieren de la proteína fágica Int y algunas proteínas bacterianas. Para el evento contrario, escisión, se requieren de Int y Xis como productos fágicos y proteínas bacterianas (Herskowitz y Hagen, 1980).

Falta página

N° 17

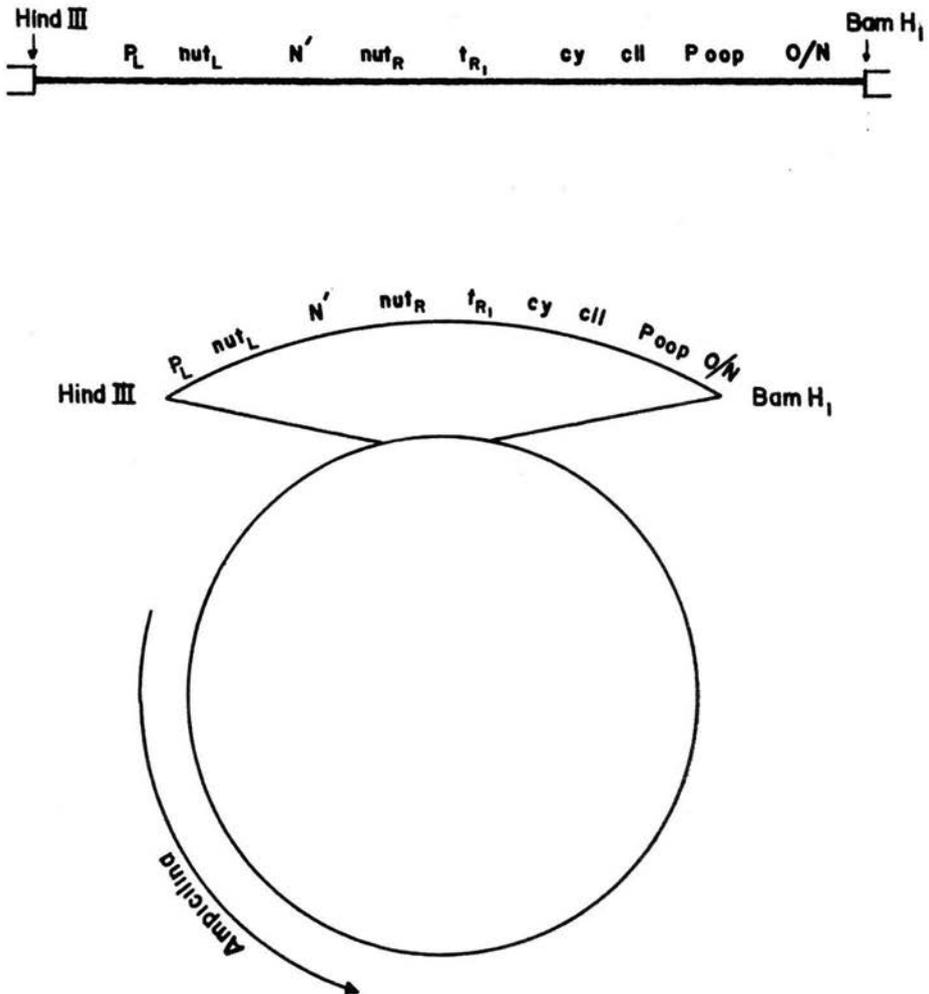
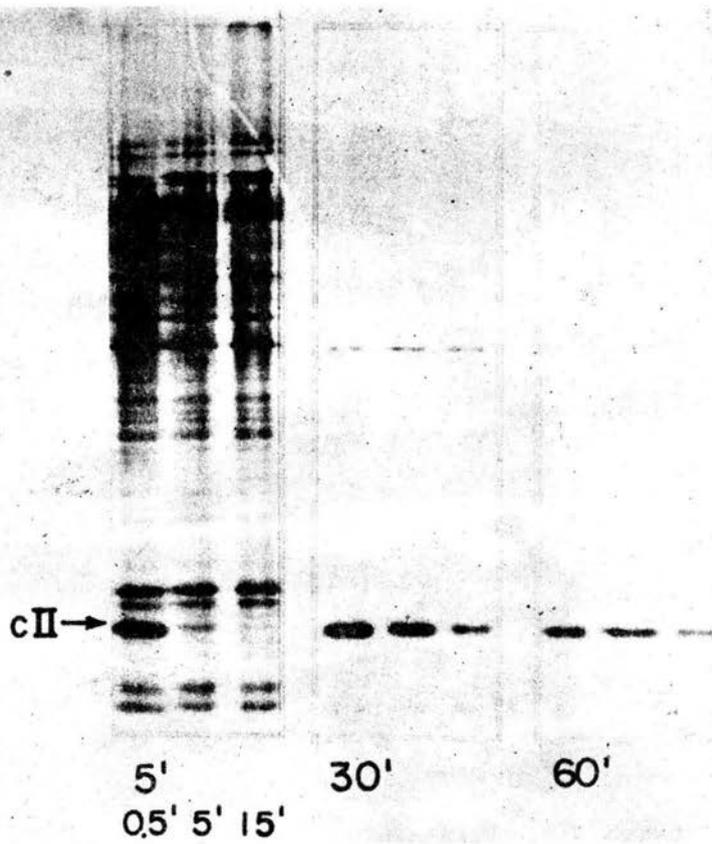


Figura 7. Mapa genético del DNA de lambda presente en el plásmido pKC30-cII.

Esta región de lambda se clonó en los sitios HindIII y BamH1 del plásmido pBR322 (Shimatake y Rosenberg, 1981).

Figura 8. Cepas lisógenas a lambda, en presencia de la proteína N con un represor termosensible y portadora del plásmido pOG7 fueron incubadas por 5, 30 y 60 minutos a 43°C en presencia de (³⁵S)metionina con cazas de 0.5, 5 y 15 minutos. A los 5 minutos de inducción, hay una gran cantidad de cII con una vida media de 1.5 minutos. La vida media de cII aumenta a 10.5 minutos, a los 30 minutos de inducción y a los 18 minutos, para 60 minutos de inducción. También hay una inhibición de proteínas bacterianas a tiempos tardíos de incubación (Rattray y colaboradores, 1982).



MATERIALES Y METODOS

Cepas: Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo provienen de Escherichia coli K12 y se encuentran en la Tabla 1.

Plásmidos:

pOG7: Figura 9 (Oppenheim et al., 1981)

pOG11: Figura 10 (Oppenheim et al., 1981)

Soluciones y medios de cultivo:

Medios de cultivo: Medio LB (triptona 10 g., extracto de levadura 5g., NaCl 10 g., se aforó a un litro con agua destilada cuando fue preparado como medio líquido. Para cajas se adicionaron 15g. de agar) medio LB+Ap (al medio LB se adicionó después de esterilizarse por autoclave, 50 µg/ml de ampicilina); medio T Ø (bactotripton 10g., NaCl 2.5 g., 2 ml de NaOH al 2%, agar 10 g. por litro); medio 56/2 (KH₂PO₄ 6.8 g., (NH₂)₂SO₄ 1 g., MgSO₄.7H₂O 0.1g., CaCl₂ 5mg., FeSO₄.7H₂O 2.5 mg. aforado a un litro pH 7.4); medio Gli-701+Ap (5.0 ml de glicerol al 0.5%, 10 ml de prolina al 2%, 5.0 ml de histidina al 1%, 10ml de isoleucina valina al 1%, 2.0 ml. de B1 al 0.1%, 2.5ml de ampicilina 25 µg/ml, 8.0 ml de biotina al 0.05%, medio 56/2 aforar a 1 litro); medio Mac-lac+Ap (40 g. MacConkey agar en 1 litro, después de autoclave agregar 10 g. lactosa y ampicilina 50 µl/ml) TMG (Tris-HCl 10⁻¹ pH 7.5, MgSO₄ 10⁻²M).

TABLA 1
LISTA DE CEPAS UTILIZADAS

<u>C E P A</u>	<u>G E N O T I P O</u>	<u>ORIGEN</u>
N99	<u>su</u> ⁻	Este laboratorio
X1	<u>F</u> ⁻ <u>su</u> <u>his</u> ⁻ <u>ilvA</u> <u>relA1</u> <u>strA</u> <u>gal</u> ⁺ <u>V8</u>	Dr. M. Gottesman
N6017**	<u>X1lacZ21</u> (<u>λi</u> ²¹ <u>lacW205bV53</u>) (<u>λint2xis1VS-XNam7,53cI857VH1</u>)	Dr. M. Gottesman
N6048*	<u>X1lacZ21</u> (<u>λi</u> ²¹ <u>lacW205bV53</u>) (<u>λint2xis1VS-XnutL3cI857VH1</u>)	Dr. M. Gottesman
N6176	N6048/pOG7	Dr. M. Gottesman
N6188	N6017(pOG7	Dr. M. Gottesman
N6249	N6017/pOG11	Dr. M. Gottesman

* N6048:lacW205 es una fusión del operón de lactosa de E. coli con el operón de triptofano, cuya transcripción depende del promotor proximal del gene int de (pI). La delección VH1 elimina genes de replicación del bacteriófago y algunos genes de la bacteria. La delección VS-H elimina genes de lisis por lo que el profago es críptico. cI857 es una mutación que confiere termosensibilidad al represor. La mutación nutL3 impide el efecto antiterminador de la proteína N por lo que la transcripción a partir de pL se detiene en tL1. Las mutaciones en los genes int y xis inhiben la escisión del profago.

** N6017: Similar a la cepa anterior con la diferencia que la transcripción a partir del promotor pL no es antiterminada debido a que el gene N tiene 2 mutaciones ámbar.

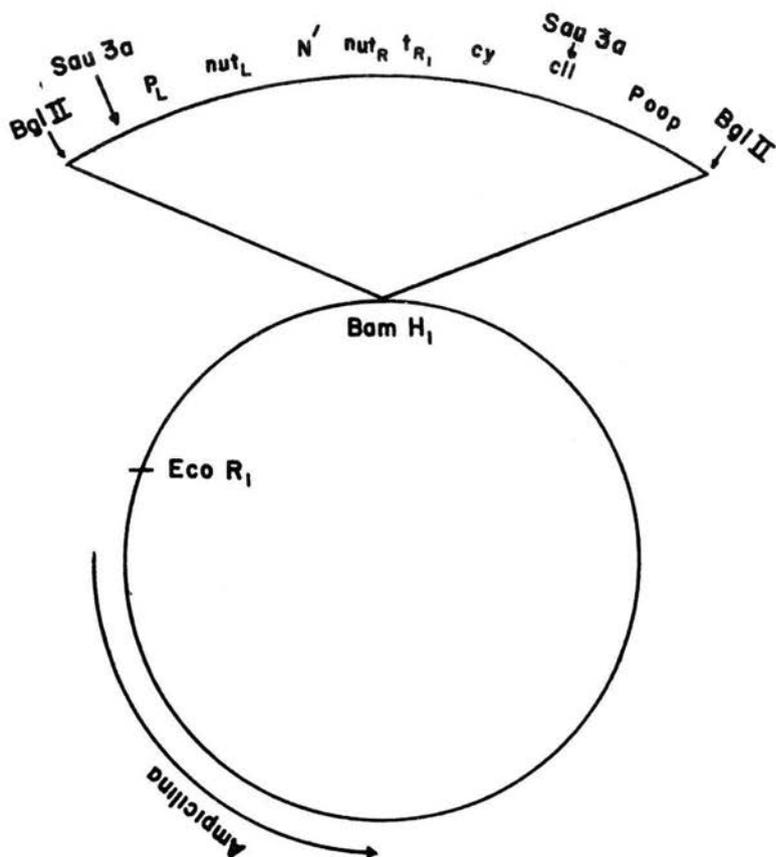


Figura 9. Mapa genético de la región de lambda en el plásmido pOG7.

El fragmento BglIII-BglIII fue clonado en el sitio BamH1 del plásmido pBR322. Este plásmido dirige la síntesis de la proteína cII a partir del promotor P_L al inducir una bacteria lisógena del profago λ_{CI857} a alta temperatura. Este plásmido presenta los genes que confieren resistencia a ampicilina.

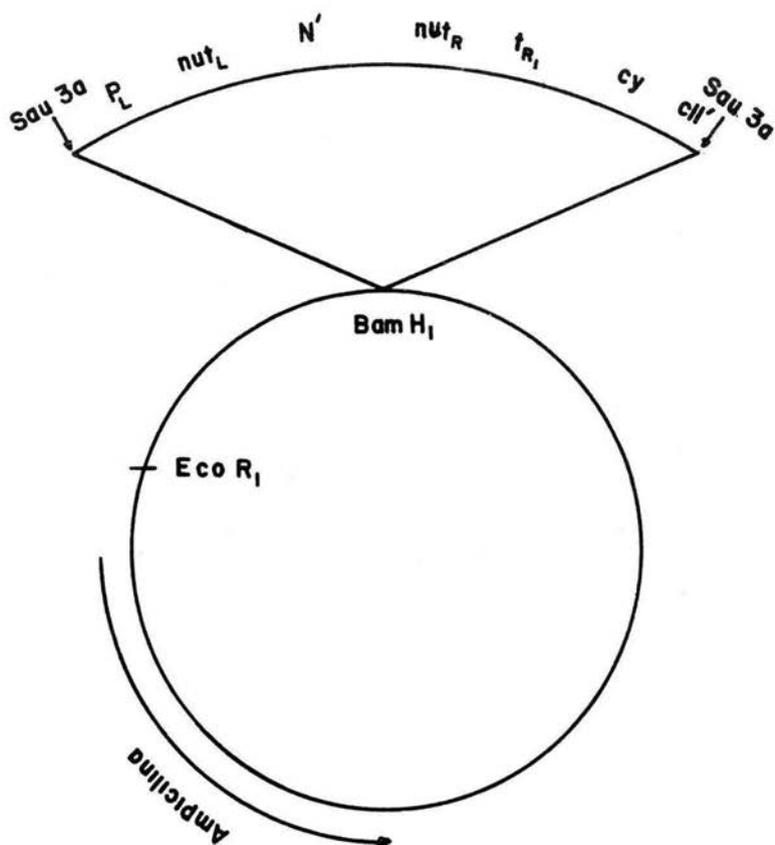


Figura 10. Mapa genético de la región de lambda en el plásmido pOG11.

El fragmento Sau3a-Sau3a fue clonado en el sitio BamH1 del plásmido pBR322. Este plásmido solo lleva la porción aminoterminal de cII. Este plásmido presenta los genes que confieren resistencia a ampicilina.

Soluciones: Buffer Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.1g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.5g., $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.246 g y 2.7 ml de β -mercaptoetanol, pH 7.0); buffer de muestra (10mM de urea, 5ml de 0.8M de DTT, 5 μ l de SDS al 10%, 5ml de azul de bromofenol al 1%); buffer de T-B (89mM Tris-OH, 89mM de ácido bórico, 2.5mM Na_2EDTA pH 8.0); buffer TE (10mM Tris-Cl pH 8, 1mM de EDTA pH 8); azul de bromofenol (azul de bromofenol al 0.125%, cianol-xileno al 0.125% glicerol al 30%, SDS al 25%, 50mM de EDTA, y 50mM de Tris-HCl pH 7.5); solución I (50mM de glucosa, 10mM de EDTA pH 8, 25mM Tris-HCl pH 8); solución II (0.2N NOOH , SDS al 1%); solución III (60 ml de 5M de acetato de potasio, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de H_2O); acrilamida 40; 0.05 (40 g. de acrilamida, 0.5 g de bis-acrilamida en 100 ml de H_2O); buffer inferior (18.17 g de Tris-OH, 4 ml de SDS al 10%, pH 8 en 100ml de H_2O); buffer de corrida (12 g de Tris base, 56 g de glicina, 20 ml de SDS al 10% y 125 ml de 8M de urea, llevar a 2 litros de H_2O).

1. Método para cuantificar el efecto letal del plásmido pOG7.

Se diluyó 100 veces un cultivo de toda la noche de las cepas N6176, N6188 y N6249 en LB+Ap hasta alcanzar una D.O. 590 nm=0.5 (aproximadamente de 2×10^8 células por mililitro). Se incubó una alícuota del cultivo a 32°C y la otra a 42°C. Se tomaron muestras a determinados tiempos espatulando en cajas de Mac-lac+Ap e incubando las cajas a 32°C por 16 h.

2. Técnica de cuenta viable.

Se determinó el número de colonias que aparecieron en cajas de Mac-lac+Ap después de diluir cultivos celulares y espatularlos. El número total de colonias se determinó por la siguiente fórmula:

$$y = \frac{n}{\text{vol} \times d}$$

Donde: y= número total de colonias por mililitro

n= número de colonias que aparecieron en las cajas

vol= volumen de alícuota espatulada

d= dilución espatulada

3. Método de mutagénesis con nitroso-guanidina (Modificado al método descrito por Miller, 1979).

A 2 ml del cultivo de células a mutagenizar (N6176 y N6188) crecidas en LB+Ap a una D.O. 590nm=1.0 (aprox. 5×10^8 células por mililitro) se agregaron 50µl de nitroso-guanidina (2.5mg por ml). Se incubaron 10 minutos a 37°C. Se centrifugó a 5krpm durante 10 minutos para asentar células, se lavó con 1 volumen de 56/2, se centrifugó a 5 krpm durante 10 minutos, se resuspendió en LB+Ap incubando el cultivo a 32°C hasta alcanzar una D.O. 590nm=0.5 (aprox. 2×10^8 células por mililitro).

4. Método de selección de mutantes sobrevivientes a la proteína CII.

Se crecieron los cultivos celulares por varios ciclos a 42°C para luego espatular alícuotas en cajas de Mac-lac+Ap incubando a 32°C. Se replicaron las colonias en el mismo tipo de cajas a 32°C y a 42°C para las bacterias mutagenizadas de N6176 y a 32°C y 39°C, las provenientes de N6188. Se escogieron aquellas bacterias que presentaron un fenotipo rosa o blanco a 32°C y rojo a alta temperatura. De esta manera, se aseguró que el progafo λimm21 estaba presente en la bacteria. Las cepas mutantes de N6176 se espatularon en cajas de LB+Ap y se incubaron a 32°C y 42°C para determinar la frecuencia de sobrevivencia a alta temperatura.

5. Método para cuantificar β-Galactosidasa (Miller, 1979)

Se crecieron cultivos de células en LB+Ap a 32°C hasta alcanzar una D.O. 650nm= 0.1 a 0.2 (aprox. 5×10^7 células por mililitro). Se indujo la síntesis de β-Galactosidasa por incubación a 42°C y se tomaron muestras a diferentes tiempos para determinar su D.O. 650nm.

Muestras de células (0.5ml) fueron lisadas con cloroformo y SDS al 0.1% y se realizó el ensayo como lo describe Miller, 1979. Tomando muestras del cultivo a 42°C a intervalos de 15 minutos durante una hora y del cultivo de 32°C, a los 60 minutos. Se preparó el medio de ensayo con:

0.9 ml de buffer Z

0.2 ml de ONPG (4 mg/ml)

0.05 ml de lisado celular

La mezcla se incubó a 28°C hasta la aparición del color amarillo, para luego detener la reacción con 0.5 ml de 1M Na₂CO₃. Se leyó su densidad óptica a 420 nm. Las unidades enzimáticas (U.E.) se determinaron con la siguiente fórmula:

$$U. E. = \frac{D.O. 420nm}{\Delta t \times vol \times D.O.650nm} \times 1000$$

Donde: U.E. = Unidades enzimáticas

Δt = Tiempo de aparición del color amarillo

vol = Volumen del extracto celular (0.05)

6. Método de curación de plásmido

Se crecieron las cepas mutantes en LB a 32°C por varios ciclos y se espatularon en cajas de LB para después de incubarlas a 32°C, replicar en cajas de LB y LB+Ap, tomando aquellas bacterias que no crecieron en presencia de ampicilina.

7. Método de extracción rápida de DNA de plásmidos (Manniatis T. et al. 1981).

Las células portadoras de los plásmidos se crecieron en 5 ml de LB+Ap toda la noche a 32°C. Se centrifugaron 3 ml de este cultivo a 15 krpm por 3 minutos y la pastilla se resuspendió en 200µl de Solución I y 20µl de lisozima

(2mg/ml), dejándose enfriar en hielo por 30 minutos para luego agregar 400µl de Solución II y después de 5 minutos a 4°C se agregaron 300µl de Solución III. Se centrifugaron a 15 krpm por 15 minutos después de enfriar en hielo por una hora y a 750µl del sobrenadante se les añadieron 450µl de isopropanol dejando en hielo por una hora, después se lavó con etanol (1 a 1/2 vol) para luego resuspender en 500µl de buffer TE. Siguiendo extracción con fenol y cloroformo.

8. Método de transformación (Manniatis, T. et. al. 1981).

Se crecieron las células a transformar en LB a 37°C. Se diluyeron 100 veces los cultivos en LB y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una D.O.590 nm=0.4 (aprox. 2×10^8 células por mililitro). Se enfriaron en hielo por 20 minutos y se centrifugaron a 5 krpm por 10 minutos resuspendiendo las pastillas en $\frac{1}{2}$ volumen de 0.05M de CaCl₂ a 4°C, centrifugando nuevamente a 5 krpm por 10 minutos y se resuspendieron las pastillas en 1/15 vol de 0.05M de CaCl₂ a 4°C. En tubos fríos se puso:

0.1 ml de 0.1M de Tris-HCl pH 7.4

1µl de DNA (40 ng/ml)

0.2 ml de células en CaCl₂

Dejándose enfriar en hielo de 5 a 15 minutos e incubando a 50°C por 2 minutos para luego espátular en cajas de LB+Ap. Observando cualitativamente la sobrevivencia al

efecto letal de los plásmidos de las cepas transformadas estriando éstas en cajas de LB y LB+Ap a baja y a alta temperatura.

9. Método de estimación de β -Lactamasa extracelular

En cajas de LB+Ap se espatuló un tapiz de bacteria sensible a ampicilina (N6017) se picó sobre este tapiz colonias de bacterias transformadas con el plásmido que les confiere resistencia a ampicilina. Aquellas bacterias portadoras del plásmido degradaron la ampicilina del medio permitiendo el crecimiento de las bacterias sensibles al antibiótico formando un halo de crecimiento. En el caso de las bacterias resistentes a la ampicilina (sin el plásmido) o aquellas transformadas con un plásmido de bajo número de copias, no degradaron la ampicilina y no hubo halo de crecimiento de las bacterias sensibles.

10. Método de detección del represor λcI , $\lambda imm21$, $\lambda imm434$ en las cepas bacterianas.

En cajas de T \emptyset se espatularon 0.2 ml de cultivos celulares (N99, N6048, N6017, LP010 a la LP070, LP303 a la LP306, N6188), y sobre este tapiz se gotearon 10 μ l (aprox. 1×10^8 ufp por mililitro) de fagos λcI , $\lambda imm21$ y $\lambda imm434$ incubando a 32°C y 42°C por 20 horas.

11. Método para preparar geles de agarosa (1%).

Se disolvió 1.5 gr de agarosa en 150 ml de buffer T-B vaciándose en la cámara de electroforesis y se colocaron las muestras con azul de bromofenol como colorante. La electroforesis se efectuó a 50V por 20 horas, tificándose con bromuro de etidio (1µg/ml).

12. Método de incorporación de (³⁵S)metionina (Descrito por Shimatake y Rosenberg, 1981, con algunas modificaciones)

Se crecieron las células (N6176, LP050, LP070, N6188, LP305 y LP306) en Gli-701+Ap a 32°C. Cuando se alcanzó una D.O.590 nm=0.3 (1.5x10⁸ células por mililitro)se aumentó la temperatura a 42°C dejando incubar 15 y 30 minutos. Se tomaron 100µl de células en presencia de 20µCi de (³⁵S)metionina dando un pulso de marca 2 minutos. Se paró la incorporación al congelar las muestras en (-70°C) hielo seco y se agregó 1 ml de TCA al 10% para luego enfriar en hielo por 15 minutos y centrifugar a 15 krpm por 15 minutos. Se añadió 0.5 ml de acetona fría, se centrifugó a 15 krpm por 10 minutos, se secó al aire y se resuspendió en 40µl de buffer de muestra y 10µl de 0.5M de DTT. Se calentaron a 95°C por 5 minutos y se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida-SDS al 18% (2.4 ml de H₂O, 3 ml de buffer inferior, 5.4 ml de Acrilamida 40:0.5, 1.2 ml de glicerol al 100%, 30µl de persulfato de amonio al 10%, 0.75 ml de 8M de urea y 3µl de TEMED).

RESULTADOS

Cuantificación del efecto letal del plásmido pOG7.

Se inició este trabajo cuantificando el efecto letal de la termoinducción de p_L del plásmido pOG7 (Figura 9) incubando cultivos de células portadoras del plásmido a alta temperatura para inactivar el represor cI857 del profago. De esta manera, se permitió la expresión de los genes de lambda presentes en el plásmido y determinar el número de bacterias sobrevivientes a lo largo del tiempo.

Como se observa en la Tabla 2 y la gráfica 1, el número de bacterias portadoras del plásmido pOG7 (resistentes a ampicilina) disminuyó drásticamente al ser incubadas a alta temperatura. En presencia de la proteína N activa (cepa N6176) la sobrevivencia disminuye 10,000 veces en 90 minutos de incubación. Mientras que en ausencia de la proteína N (cepa N6188) la letalidad fue de aproximadamente 100 veces en 90 minutos. Los controles $N^-/cII^-(N6249)$ a 32° y 42°C, $N^+/cII^+(N6176)$ y $N^-/cII^+(N6188)$ a 32°C continuaron creciendo.

Aislamiento de mutantes.

Para estudiar el efecto letal se aislaron mutantes que sobrevivieron a alta temperatura en presencia del plásmido pOG7. Para lo cual se mutagenizaron con nitroso-guanidina las cepas $N^+/cII^+(N6176)$ y $N^-/cII^+(N6188)$, se aislaron 11 mutantes, 7 correspondientes para la cepa N6176 denominadas: LP010, LP020, LP030, LP040, LP050, LP060 y LP070 y 4 para N6188 llamadas LP303, LP304, LP305 y LP306.

TABLA 2. Cuantificación del efecto letal del plásmido pOG7. Cultivos celulares de toda la noche fueron diluidos 100 veces en LB+Ap incubados a 32°C hasta alcanzar una $D.O._{590} = 0.5$ (aproximadamente 2×10^8 células por mililitro). Se incubó una alícuota a 32°C y otra a 42°C. Para las cepas N^+/cII^+ (N6176) y $N^-/cII^-(N6249)$ se tomaron muestras cada 15 minutos por 90 minutos, mientras que para la cepa $N^-/cII^+(N6188)$, las muestras se obtuvieron cada hora por tres horas y se determinó cuenta viable.

* Fracción sobreviviente: cuenta viable a 42°C a tiempo tx/ cuenta viable a 32°C a tiempo tx.

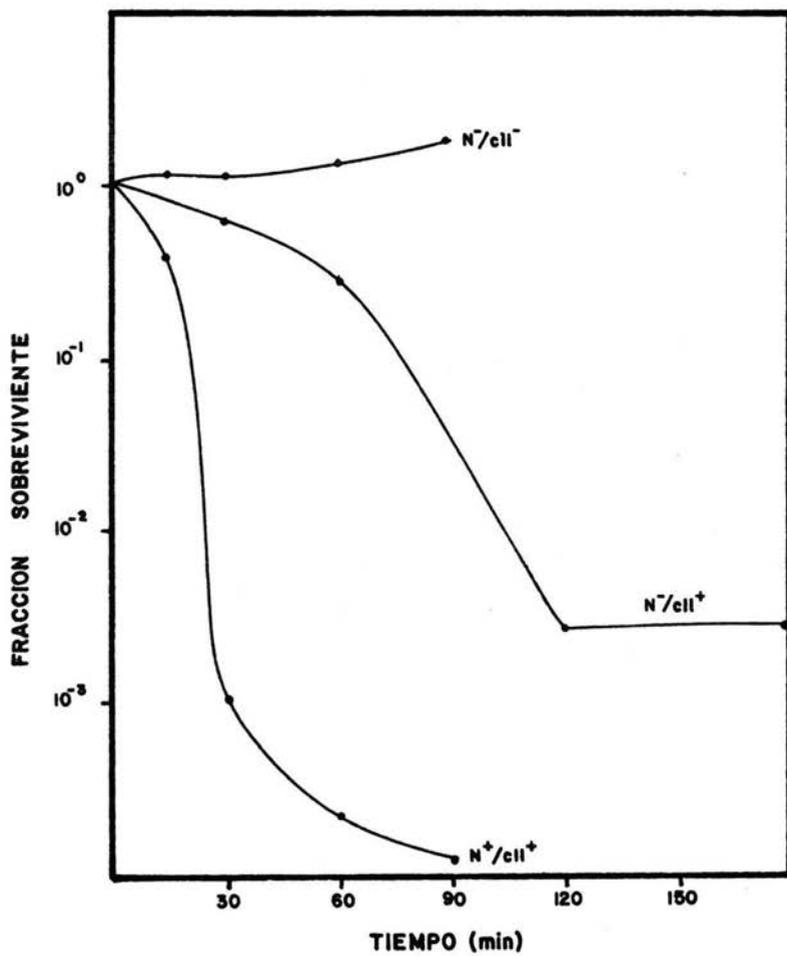
TABLA 2

CUANTIFICACION DEL EFECTO LETAL DEL PLASMIDO pOG7

FRACCION SOBREVIVIENTE*

<u>TIEMPO</u>	<u>C E P A S</u>		
	<u>N⁺/cII⁺</u>	<u>N⁻/cII⁺</u>	<u>N⁻/cII⁻</u>
0	1	1	1
15	0.39	-	1.16
30	1.25x10 ⁻³	-	1.05
60	2.27x10 ⁻⁴	3.3x10 ⁻¹	1.24
90	1.11x10 ⁻⁴	-	2.25
120	-	3.0x10 ⁻³	-
180	-	3.5x10 ⁻³	-

GRAFICA 1. Cuantificación del efecto letal del plásmido pOG7. Cultivos celulares de toda la noche fueron diluidos 100 veces en LB+Ap incubados a 32°C hasta alcanzar una D.O.₅₉₀ = 0.5 (aproximadamente 2×10^8 células por mililitro). Se incubó una alícuota a 32°C y otra a 42°C. Para las cepas N⁺/cII⁺(N6176) y N⁻/cII⁻(N6249) se tomaron muestras cada 15 minutos por 90 minutos, mientras que para la cepa N⁻/cII⁺(N6188), las muestras se obtuvieron cada hora por tres horas y se determinó cuenta viable. Fracción sobreviviente: cuenta viable a 42°C a tiempo tx/ cuenta viable a 32°C a tiempo tx.



GRAFICA 1

En la caracterización de las mutantes se analizaron sus fenotipos en Mac-lac+Ap, fueron rosas a 32°C y rojas a 42°C, asegurándose de esta forma la presencia del gene lacZ, controlando por cI. Después de crecer las cepas mutantes en LB+Ap a 32°C se determinó cuenta viable al incubar las cajas de LB+Ap a 32°C y 42°C con los resultados de la Tabla 3. Como se observa, las 7 mutantes sobrevivieron a alta temperatura en presencia de ampicilina, lo que sugiere que además de poseer el plásmido pOG7, son resistentes a la desrepresión y probablemente al efecto letal de la proteína cII. La cepa N⁺/cII⁺ (N6176) disminuyó 10,000 veces y la cepa N6249, portadora del plásmido pOG11, sobrevivió a alta temperatura.

Las 4 mutantes provenientes de la cepa N⁻/cII⁺ (N6188) fueron aisladas a 39°C, no fué posible obtener mutantes de esta cepa a 42°C. Se determinaron sus fenotipos en Mac-lac+Ap produciendo colonias de color rosa a baja temperatura y rojas, a alta. Lo que sugiere que la actividad de cII no se ha perdido.

Localización de las mutaciones.

Como siguiente paso en la caracterización de las mutantes se procedió a determinar la localización de las mutaciones que conferían a las cepas mutantes la capacidad de sobrevivir a alta temperatura.

Como se observa en la Tabla 4, las cepas mutantes son capaces de sobrevivir a alta temperatura mientras que los contro-

TABLA 3. Sobrevivencia de las cepas mutantes a la termoinducción. La cuantificación de sobrevivencia se realizó como se describe en material y método. Se espatularon 0.2 ml de cultivos de células de toda la noche en cajas de LB+Ap y se incubaron a 32°C y 42°C por 20 horas. Se determinó cuenta viable.

* Sobrevivencia: cuenta viable a 42°C/cuenta viable a 32°C.

TABLA 3

SOBREVIVENCIA DE LAS CEPAS MUTANTES A LA TERMOINDUCCION

<u>C E P A</u>	<u>CUENTA VIABLE</u>		<u>SOBREVIVENCIA*</u>
	<u>TEMPERATURA</u>		
	<u>32°</u>	<u>42°</u>	
LP010	9×10^7	8×10^7	0.88
LP020	5×10^8	3×10^8	0.66
LP030	1.5×10^9	1.8×10^9	1.2
LP040	1×10^9	1.6×10^9	1.6
LP050	1×10^8	1.1×10^8	1.1
LP060	2×10^8	2.5×10^8	1.25
LP070	4×10^7	2×10^7	0.5
N ⁺ /cII ⁺	6.8×10^8	1×10^4	1.4×10^{-5}
N ⁻ /cII ⁻	5×10^9	3×10^9	0.61

TABLA 4. Sobrevivencia de las mutantes al plásmido pOG7. Colonias bacterianas fueron resuspendidas en TMG y se estriaron en cajas de LB+Ap e incubadas a la temperatura indicada para determinar sobrevivencia cualitativa.

* Las otras 6 mutantes (LP020, LP030, LP040, LP050, LP060 y LP070) crecieron en ambas temperaturas.

** Las otras 3 cepas mutantes (LP304, LP305 LP306) crecieron en ambas temperaturas.

+ Crecimiento.

- Ausencia de crecimiento.

TABLA 4

SOBREVIVENCIA DE LAS MUTANTES AL PLASMIDO pOG7

<u>C E P A</u>	<u>TEMPERATURA</u>	
	<u>32°</u>	<u>42°</u>
LP010*	+	+
N ⁺ /cII ⁺	+	-
N ⁺	-	-
	<u>32°</u>	<u>39°</u>
LP303**	+	+
N ⁻ /cII ⁺	+	-
N ⁻	-	-

les (N6176 y N6188) no crecen a alta temperatura y las cepas que no poseen el plásmido (N6048 y N6017) no crecen en presencia de ampicilina.

Se procedió a curar las cepas mutantes y posteriormente fueron transformadas con el plásmido pOG7 silvestre. Los resultados de la Tabla 5 (líneas 1, 2 y 3) sugieren que en las cepas bacterianas LP010, LP020, LP030, LP040, LP050, LP060 y LP070, la mutación se localiza en el genoma bacteriano, ya que al transformar las cepas mutantes con un plásmido pOG7 silvestre son capaces de sobrevivir a alta temperatura.

Por otro lado, el comportamiento de las cepas mutantes LP303, LP304, LP305 y LP306 es diferente al de las mutantes aisladas en presencia de la proteína N, pues al transformar las cepas mutantes con un plásmido silvestre, la cepa no es capaz de sobrevivir a alta temperatura como se observa en la Tabla 5 (línea 4), lo que sugiere mutaciones en los plásmidos. Para corroborar esta aseveración se procedió a transformar la cepa silvestre (N6017) con los siguientes plásmidos mutantes extraídos de las cepas LP303, LP304, LP305 y LP306 y ensayar su termolabilidad. Como se muestra en la Tabla 5 (línea 5) las transformantes portadoras del plásmido mutagenizado son capaces de sobrevivir a alta temperatura, siendo resistentes al efecto letal de la proteína cII, lo que sugiere que la mutación en estas cepas se localiza en el plásmido.

TABLA 5. Localización de la mutación que confiere resistencia a la proteína cII. Las colonias purificadas fueron resuspendidas en TMG y se estiraron asadas en cajas de LB+Ap e incubadas a la temperatura indicada. Se determinó supervivencia cualitativa.

* LP100: LP010 curada y transformada con pOG7 silvestre. Las otras mutantes se comportaron igual.

** LP323: LP303 curada y transformada con pOG7 silvestre. Las otras cepas mutantes se comportaron igual.

*** LP333: N6017 transformada con el plásmido de la cepa LP303. Las otras cepas transformadas se comportaron igual.

+ Crecimiento.

- Ausencia de crecimiento.

TABLA 5

LOCALIZACION DE LA MUTACION QUE CONFIERE RESISTEN-
CIA A LA PROTEINA cII.

<u>C E P A</u>	<u>TEMPERATURA</u>	
	<u>32°</u>	<u>42°</u>
LP100*	+	+
N ⁺ /cII ⁺	+	-
N ⁺	-	-
	<u>32°</u>	<u>39°</u>
LP323**	+	+
LP333***	+	+
N ⁻ /cII ⁺	+	-
N ⁻	-	-

Actividad de la proteína cII en las mutantes.

Una manera indirecta para medir la actividad de la proteína cII es por ensayos de β -Galactosidasa, ya que la proteína cII activa al promotor p_I que transcribe al gene z adyacente a int (Figura 11) produciéndose β -Galactosidasa que es detectada cuando la enzima hidroliza al compuesto orto-nitrofenol galactosido (ONPG) en orto-nitrofenol y galactosa. Se utilizó este ensayo para determinar los niveles de la actividad de la proteína cII. Los resultados de la Tabla 6 muestran que a 32°C hay dos grupos de mutantes. Uno se comporta como la cepa silvestre N6176 (cepas LP010, LP040 y LP050, líneas 2, 5 y 6); el otro grupo presenta niveles de β -Galactosidasa menores (cepas LP020, LP030, LP060 y LP070, líneas 3, 4, 7 y 8).

Sin embargo a 42°C los niveles de β -Galactosidasa en las cepas mutantes, se ve disminuida en relación al tipo silvestre y esta diferencia es de 3.5 a 20 veces. Lo que sugiere que la acción de la proteína cII de las mutantes LP020, LP030, LP060 y LP070 está disminuida con respecto a la bacteria silvestre y este efecto se acentúa a 42°C en todas las mutantes.

De forma similar al ensayo realizado para las mutantes aisladas en presencia de la proteína N se procedió a determinar unidades enzimáticas de β -Galactosidasa para las mutantes procedentes de la cepa N^-/cII^+ . Como se observa en la Tabla 7 la proteína cII está presente en las bacterias mutadas activando la síntesis de β -Galactosidasa. Sin embargo, no se presenta un incremento de β -Galactosidasa a 42°C por lo que la

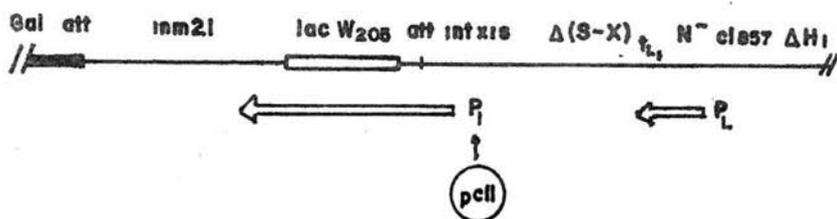


Figura 11. Estructura de los profagos presentes en la cepa N6188.

La transcripción a partir del promotor P_L se detiene por la ausencia de la proteína N. El promotor P_I es activado por pCII, del plásmido pOG7, transcribiendo genes adyacentes al gene int. Se previene la escisión de los profagos por las mutaciones int2 y xis1. Las deleciones VS-X y VH1 eliminan funciones virales letales para la bacteria.

TABLA 6. Actividad de la proteína cII en las mutantes aisladas en presencia de la proteína N. Se crecieron cultivos celulares en LB+Ap a 32°C hasta alcanzar una D.O.₆₅₀ = 0.1 a 0.2 (aproximadamente 5×10^7 células por mililitro). Se indujo la síntesis de β -Galactosidasa al incubar a 42°C y se determinaron unidades enzimáticas de β -Galactosidasa como lo describe Miller, 1979.

TABLA 6

ACTIVIDAD DE LA PROTEINA cII EN LAS MUTANTES AISLADAS
EN PRESENCIA DE LA PROTEINA N.

<u>CEPA</u>	<u>UNIDADES ENZIMATICAS DE β-GALACTOSIDASA</u>		
	<u>T E M P E R A T U R A</u>		
	<u>32°</u>	<u>42°</u>	<u>42°/32°</u>
N^+/cII^+	171.39	359.97	2.1
LP010	202.83	106.66	0.52
LP020	79.86	23.37	0.3
LP030	75.52	52.58	0.69
LP040	131.47	107.52	0.81
LP050	161.19	102.09	0.63
LP060	61.43	18.71	0.3
LP070	76.72	64.35	0.83

TABLA 7. Actividad de la proteína cII en las
mutantes aisladas en ausencia de la proteína N.

Se crecieron cultivos celulares en LB+Ap a 32°C hasta alcanzar una D.O.₆₅₀ = 0.1 a 0.2 (aproximadamente 5×10^7 células por mililitro). Se indujo la síntesis de β -Galactosidasa al incubar a 42°C y se determinaron unidades enzimáticas de β -Galactosidasa como lo describe Miller, 1979.

TABLA 7

ACTIVIDAD DE LA PROTEINA cII EN LAS MUTANTES AISLADAS
EN AUSENCIA DE LA PROTEINA N

<u>C E P A</u>	<u>UNIDADES ENZIMATICAS DE β-GALACTOSIDASA</u>		
	<u>T E M P E R A T U R A</u>		
	<u>32°</u>	<u>42°</u>	<u>42°/32°</u>
N ⁻ /cII ⁺	182.27	898.99	4.93
LP303	287.6	339.1	1.17
LP304	90.86	167.07	1.83
LP305	175.09	123.79	0.7
LP306	295.1	291.0	0.98

relación 42°C/32°C es cercana a 1, a diferencia de la cepa silvestre N6188 donde la relación es de 4.93. El comportamiento de las bacterias mutantes aisladas en condiciones N⁻ (Tabla 7) es diferente al de las mutantes en presencia de la proteína N (Tabla 6), pues en las primeras los niveles basales de la proteína cII son similares a la cepa silvestre y la disminución en la síntesis de β-Galactosidasa a 42°C es de 2.65 a 7.26 veces. Mientras que para las mutantes aisladas en presencia de la proteína N la producción de enzima a alta temperatura se ve disminuida.

Al comparar los niveles de enzima para la cepa N⁺/cII⁺ Tabla 6: (línea 1) y los de la cepa N⁻/cII⁺ Tabla 7 (línea 1) se ve una diferencia tanto en la producción de enzima como en la relación 42°C/32°C. Esto se explica por el efecto letal al desreprimir al plásmido que se ve acentuado en condiciones N⁺ y a tiempos tempranos de inducción (Tabla 2).

Para las mutantes aisladas en ausencia de la proteína N se procedió a determinar la cinética de producción de β-Galactosidasa en las bacterias curadas y transformadas con pOG7 silvestre así como en la cepa N6017 transformada con los plásmidos de las cepas mutantes, los resultados se encuentran en las gráficas 2, 3, 4 y 5.

Como se observa en la gráfica 2, la cepa LP323 (cepa LP303 curada y transformada con pOG7 silvestre) presenta una curva similar a la de la cepa N6188 y la cepa LP333 (N6017

transformada con el plásmido pLP303) tiene una cinética de producción de β -Galactosidasa mucho mayor que la cepa silvestre, lo que sugirió que la proteína cII de este plásmido es más eficiente.

En la gráfica 3, la curva para la cepa N6188 es la del valor más alto, pues para LP324 se comprobó su fenotipo en cajas de Mac-lac+Ap y las colonias blancas indicaron que la cepa había perdido el profago λ_{imm21} y no podía sintetizar β -Galactosidasa y la cepa LP334, produjo muy poca enzima.

Las cepas mutantes de la gráfica 4 tienen un comportamiento similar a las cepas LP323 y LP333, presentan los valores mayores en comparación con la cepa silvestre N6188. Sin embargo, en este caso, la cepa portadora del plásmido silvestre (LP325) produjo más enzima que la cepa silvestre transformada con el plásmido pLP305.

Y como lo muestra la gráfica 5, la cepa LP326 es la de mayor síntesis de enzima y la cepa LP336, presenta una cinética similar a la de la cepa N6188 a 32°C.

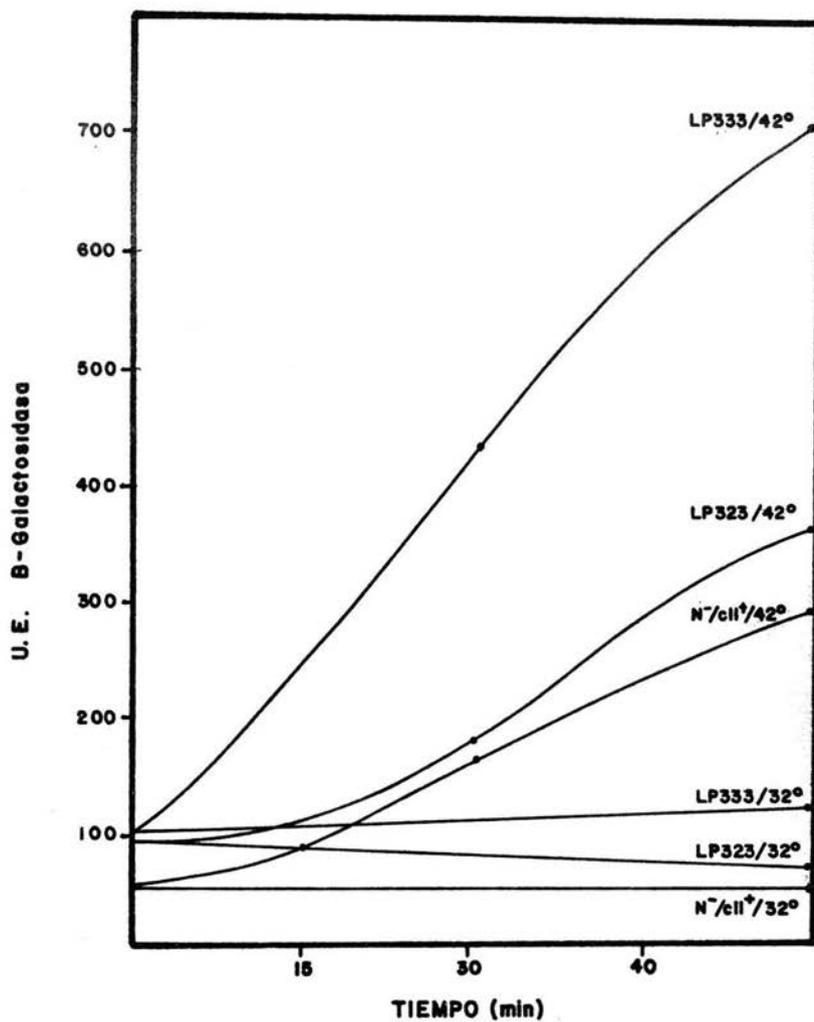
Debido a la posibilidad que las cepas LP334 y LP336 hubieran perdido el plásmido, se decidió una estimación de β -lactamasa extracelular.

GRAFICA 2. Cinética de producción de β -Galactosidasa en las cepas N6188, LP323 y LP333. Cultivos celulares se crecieron en LB+Ap hasta alcanzar $D.O._{650} = 0.1-0.2$ (aprox. 5×10^7 células por mililitro). Se indujo la síntesis de β -Galactosidasa por incubación a 42°C . Se tomaron muestras cada 15 minutos por una hora del cultivo de 42°C y muestras a una hora del cultivo a 32°C .

N^-/cII^+ = N6188

LP323 = LP303 curada y transformada con pOG7

LP333 = N6017 transformada con pLP303



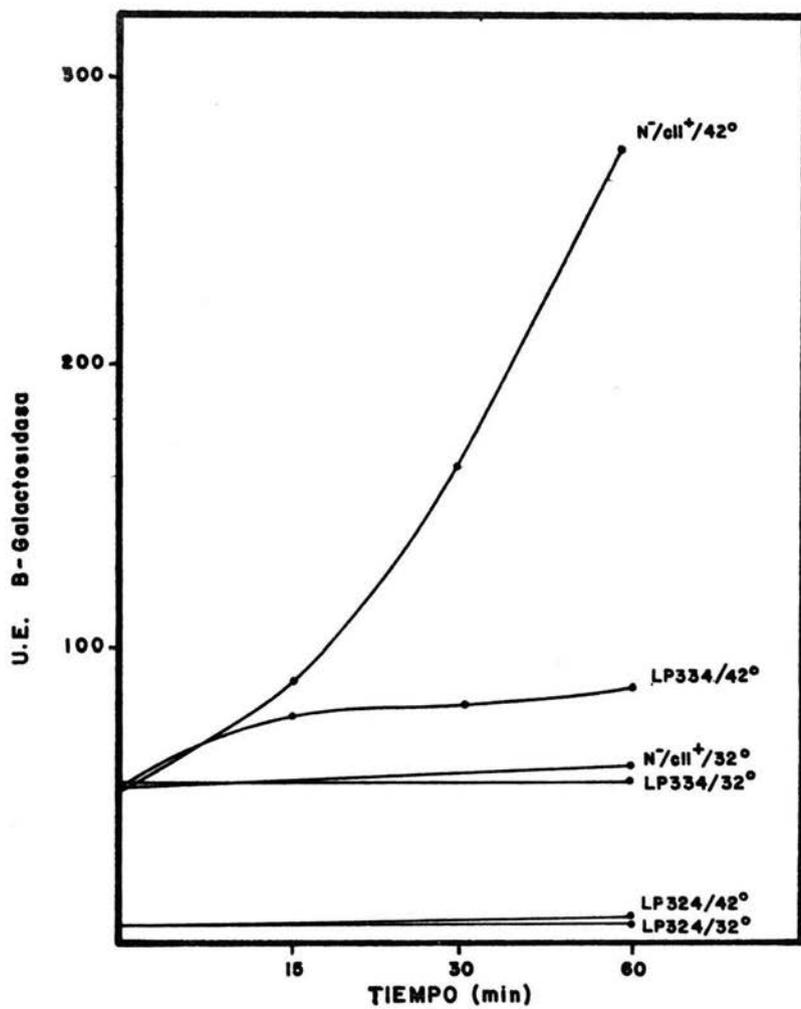
GRAFICA 2

GRAFICA 3. Cinética producción de β -Galactosidasa en las cepas N6188, LP324 y LP334. Cultivos celulares se crecieron en LB+Ap y hasta alcanzar $D.O._{650} = 0.1-0.2$ (aprox. 5×10^7 células por mililitro). Se indujo la síntesis de β -Galactosidasa por incubación a $42^\circ C$. Se tomaron muestras cada 15 minutos por una hora del cultivo de $42^\circ C$ y muestras a una hora del cultivo a $32^\circ C$.

N^-/cII^+ = N6188

LP324 = LP304 curada y transformada con POG7

LP334 = N6017 transformada con pLP304



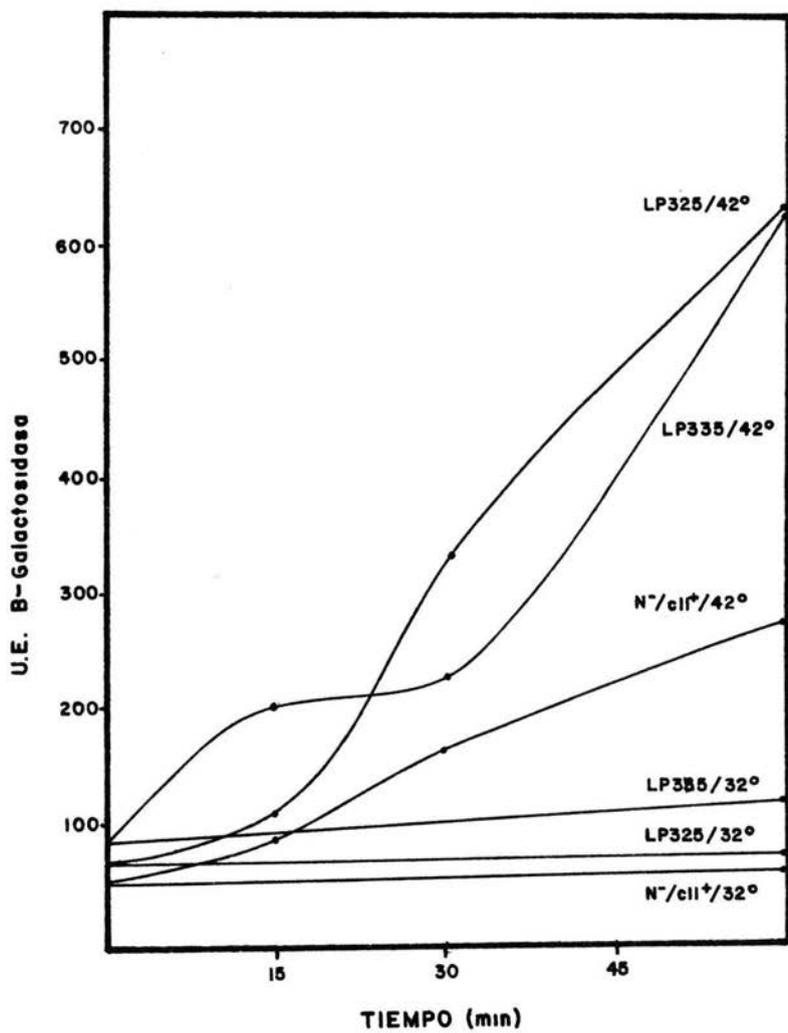
GRAFICA 3

GRAFICA 4. Cinética de producción de β -Galactosidasa en las cepas N6188, LP325 y LP335. Cultivos celulares se crecieron en LB+Ap hasta alcanzar $D.O._{650} = 0.1-0.2$ (aprox. 5×10^7 células por mililitro). Se indujo la síntesis de β -Galactosidasa por incubación a $42^\circ C$. Se tomaron muestras cada 15 minutos por una hora del cultivo de $42^\circ C$ y muestras a una hora del cultivo a $32^\circ C$.

N^-/cII^+ = N6188

LP325 = LP305 curada y transformada con pOG7

LP335 = N6017 transformada con pLP305



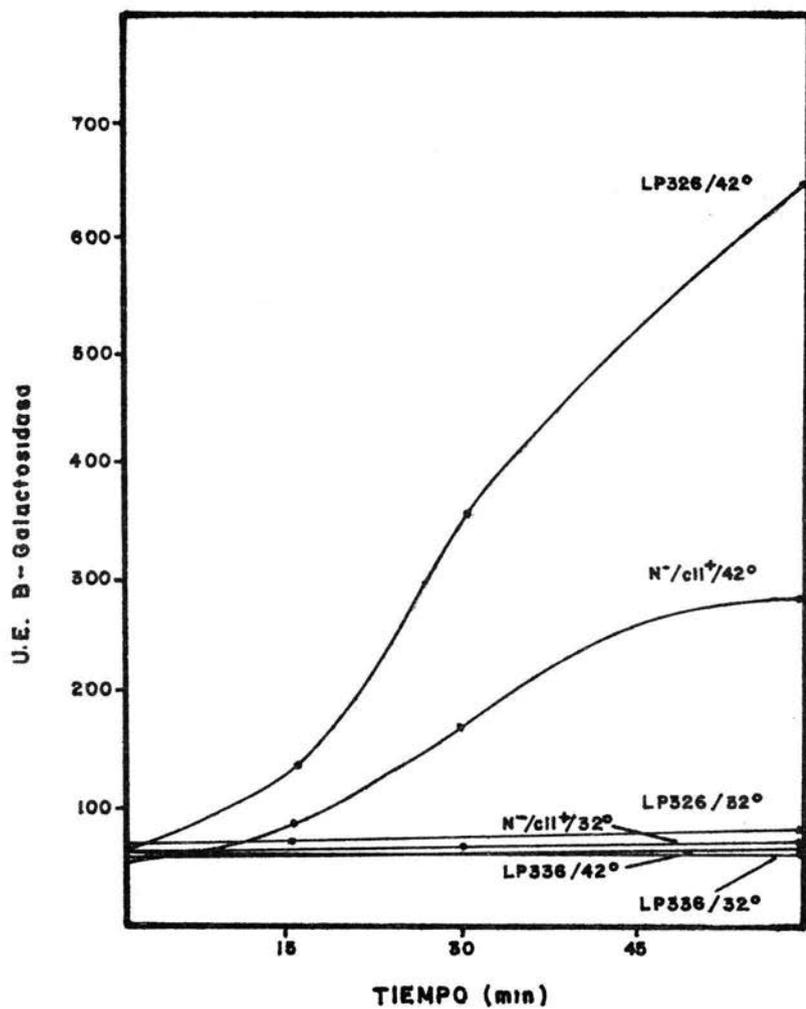
GRAFICA 4

GRAFICA 5. Cinética de producción de β -Galactosidasa en las cepas N6188, LP326 y LP336. Cultivos celulares se crecieron en LB+Ap hasta alcanzar $D.O._{650} = 0.1-0.2$ (aprox. 5×10^7 células por mililitro). Se indujo la síntesis de β -Galactosidasa por incubación a 42°C . Se tomaron muestras cada 15 minutos por una hora del cultivo de 42°C y muestras a una hora del cultivo a 32°C .

N^-/cII^+ = N6188

LP326 = LP306 curada y transformada con pOG7

LP333 = N6017 transformada con pL306



GRAFICA 5

Estimación de β -Lactamasa extracelular.

Los plásmidos pOG7 y pOG11 confieren resistencia para ampicilina pues la enzima β -Lactamasa es sintetizada constitutivamente y excretada al medio degradando la ampicilina presente. Bacterias sensibles al antibiótico pueden crecer en presencia de ampicilina siempre y cuando haya β -Lactamasa en el medio (Davis y Rown, 1969) y crecerán formando un halo, mientras que si se trata de bacterias resistentes al antibiótico, sin tener β -Lactamasa o bien, de bacterias con baja producción de la enzima, no habrá formación del halo de crecimiento. Debido a los bajos niveles de β -Galactosidasa producidos por las cepas LP334 y LP336, se realizaron pruebas de β -Lactamasa sobre un tapiz de N6017. Como se observa en la Tabla 8 (líneas 6 y 12) las cepas LP334 y LP336 no producen halo de crecimiento. Para descartar la posibilidad de que estas cepas fueran resistentes a ampicilina sin el plásmido, se realizó extracción del DNA y se corrieron geles de agarosa al 1% (resultados no mostrados), observándose el plásmido en todos los casos. Lo que sugiere que el plásmido de las cepas LP334 y LP336 está en bajo número de copias, explicándose los bajos niveles de β -Galactosidasa de las gráficas 3 y 5.

Detección del represor λ cI de las cepas mutantes.

Por los resultados de sobrevivencia a alta temperatura de las cepas mutantes LP010, LP020, LP030, LP040, LP050, LP060 y LP070 (Tabla 4) y de estas mismas curadas y transformadas con un plásmido pOG7 silvestre (Tabla 5, línea 1), se procedió a determinar en que parte del genoma bacteriano lo localizaba

TABLA 8. Ensayo de β -Lactamasa. En cajas de LB+Ap se espatuló 0.2 ml de un cultivo de toda la noche de N6017 crecida en LB. Sobre este tapiz se picaron colonias incubando las cajas a la temperatura indicada.

- + Presencia de halo de crecimiento.
- Ausencia del halo de crecimiento.

TABLA 8

ESTIMACION DE β -LACTAMASA

<u>C E P A</u>	<u>TEMPERATURA</u>	
	<u>32°</u>	<u>39°</u>
LP303	+	+
LP323	+	+
LP333	+	+
LP304	+	+
LP324	+	+
LP334	-	-
LP305	+	+
LP325	+	+
LP335	+	+
LP306	+	+
LP326	+	+
LP336	-	-
N ⁻ /cII ⁺	+	+

la mutación que confería resistencia a la proteína cII. Por lo que se decidió comprobar los profagos presentes en la cepa lisógena. Sobre un tapiz de bacteria lisógena se gotean fagos de la inmunidad que se quiera probar. Por la característica de los profagos de conferir inmunidad a la bacteria de ser infectada por fagos de la misma inmunidad no se inhibe el crecimiento bacteriano.

Como se observa en la Tabla 9 el fago λcI no es capaz de producir placa de lisis a ambas temperaturas en las bacterias mutantes a diferencia de la cepa silvestre (N6176) que a alta temperatura el represor termosensible del profago (cI857) se inactiva y el fago produce placa de lisis. Por lo que se concluye que las bacterias mutantes presentan un represor cI termoestable que a alta temperatura sigue reprimiendo las funciones virales y confiriendo inmunidad a la bacteria lisógena.

El comportamiento de la cepa silvestre y de las cepas mutantes con el fago $\lambda_{imm}21$ es igual, presentando en todos los casos un represor termoestable que no permite que los fagos infecten a la bacteria. Y el control $\lambda_{imm}434$ produce placa de lisis en todos los casos así como la bacteria N99 que es infectada por los fagos a ambas temperaturas.

Al realizar las pruebas de inmunidad para las cepas LP303, LP304, LP305 y LP306 (Tabla 10) no se detecta ningún cambio a nivel de represión de los profagos y el profago $cI857$ persiste con su carácter termosensible.

TABLA 9. Prueba de inmunidad para las cepas mutantes en presencia de la proteína N.

Sobre un tapiz de bacteria se gotea 10 μ l de fago (aproximadamente 1×10^8 ufp/ml) incubando las cajas a la temperatura indicada por 16 horas.

* LP010: Las 7 mutantes se comportaron igual.

TABLA 9

PRUEBA DE INMUNIDAD PARA LAS CEPAS MUTANTES
AISSLADAS EN PRESENCIA DE LA PROTEINA N

<u>C E P A</u>	<u>TEMPERATURA</u>	<u>F A G O S</u>		
		<u>λcI</u>	<u>λimm21</u>	<u>λimm434</u>
N99	32°/42°	+	+	+
LP010*	32°	-	-	+
	42°	-	-	+
N ⁺ / <u>cII</u> ⁺	32°	-	-	+
	42°	+	-	+

TABLA 10. Prueba de inmunidad para las cepas mutantes en ausencia de la proteína N.

Sobre un tapiz de bacteria se gotea 10 μ l de fago (aproximadamente 1×10^8 ufp/ml) incubando las cajas a la temperatura indicada por 16 horas.

* LP303: Las 4 mutantes se comportaron igual.

TABLA 10

PRUEBA DE INMUNIDAD PARA LAS CEPAS MUTANTES

AISLADAS EN AUSENCIA DE LA PROTEINA N

<u>C E P A</u>	<u>TEMPERATURA</u>	<u>F A G O S</u>		
		<u>λ_{cI}</u>	<u>λ_{imm21}</u>	<u>λ_{imm434}</u>
N99	32°/39°	+	+	+
LP303*	32°	-	-	+
	39°	+	-	+
N^- / \underline{cII}^+	32°	-	-	+
	39°	+	-	+

Análisis de proteínas bacterianas por incorporación de (³⁵S) metionina.

Para determinar la presencia de la proteína cII en el sistema y la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas se realizaron experimentos de incorporación de metionina radiactiva para ser analizados en geles de poliacrilamida-SDS. Se inactivó el represor cI857 al incubar los cultivos celulares a 42°C por 15, 30 y 60 minutos dando un pulso de marca de 2 minutos en presencia de 20 µCi de (³⁵S)metionina y enfriándose a -70°C para posteriormente analizarlos en geles.

Como se observa en la Figura 12 la cepa N⁺/cII⁺(N6176), portadora del plásmido pOG7, presenta una banda para la proteína cII así como una inhibición en la síntesis de proteínas bacterianas, a diferencia de la cepa portadora del plásmido pOG11 donde no hay una banda para la proteína cII ni inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas.

Para la Figura 13 se observa que las cepas mutantes aisladas en presencia de la proteína N (LP050 y LP060) no presentan bandas correspondiente a cII ni a los 15 ni 30 minutos de inducción y las bandas correspondientes a las demás proteínas bacterianas aumentan de intensidad a diferencia de la cepa N6176.

Para la Figura 14, la cepa N⁺/cII⁺ (N6176) produce mayor cantidad de cII y el efecto de inhibición de síntesis de proteínas es más drástico que en la cepa N⁻/cII⁺(N6188) .

FIGURA 12. Autorradiografía del gel de poliacrilamida-SDS al 18% de las cepas A (N^+/cII^+) y B (N^+/cII^-). Crecidas en Gli-701+Ap a 32°C.

Cuando se alcanzó una D.O. $_{590} = 0.3$ (aproximadamente 1.5×10^8 células por mililitro) se aumentó la temperatura a 42°C por 0, 15, 30 y 60 minutos. Se tomaron 100 μ l de células en presencia de 20 μ Ci (35 S)metionina con un pulso de marca de 2 minutos. Se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida-SDS al 18%.

A = N6176 B = N6048/pOG11

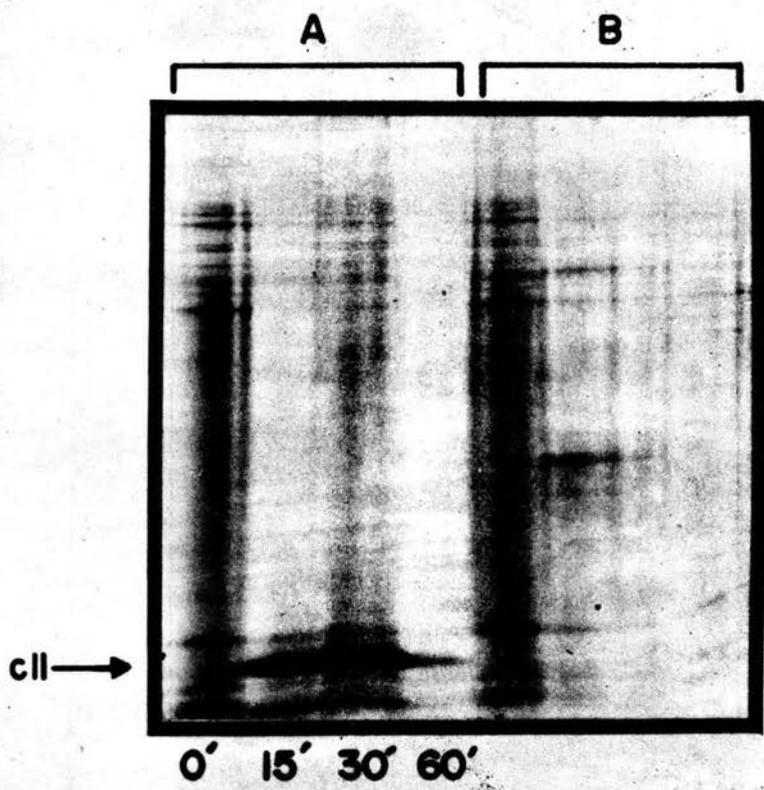


FIGURA 13. Autorradiografía del gel de poliacrilamida-SDS al 18% de las cepas A (N^+ / cII^+), B (LP050) y C (LP070). Se crecieron las células en Gli-701+Ap a 32°C. Cuando se alcanzó una D.O. $_{590} = 0.3$ (aproximadamente 1.5×10^8 células por mililitro) se aumentó la temperatura por 0, 15 y 30 minutos a 42°C. Se tomaron 100 μ l de células en presencia de 20 μ Ci de (35 S) metionina con un pulso de marca de 2 minutos. Se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida-SDS al 18%.

A = N6176 B = cepa LP050 C = cepa LP070

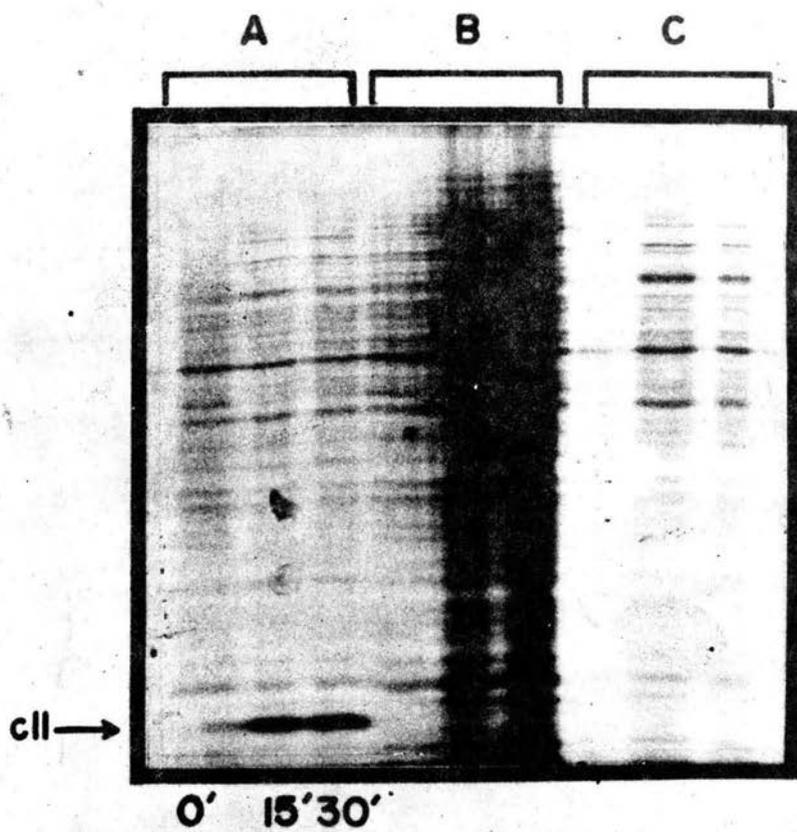
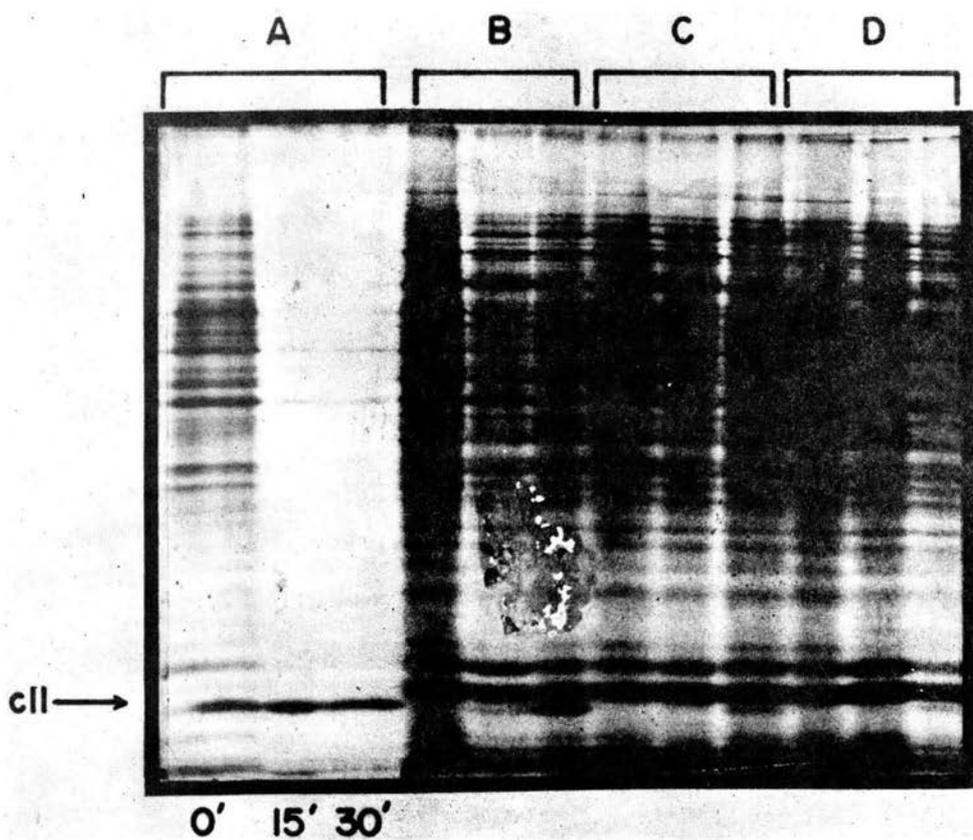


FIGURA 14. Autorradiografía de gel de poliacrilamida-SDS al 18% de las cepas A (N^+/cII^+), B (N^-cII^+) C (LP305) y D (LP300). Se crecieron las células en Gli-701+Ap a 32°C. Cuando se alcanzó una D.O.₅₉₀ = 0.3 (aproximadamente 1.5×10^8 células por mililitro) se aumentó la temperatura a 42°C por 0, 15 y 30 minutos. Se tomaron 100 μ l de células en presencia de 20 μ Ci de (35 S)metionina por 2 minutos. Se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida-SDS al 18%.

A = N6176 B = N6188 C = LP305 D = LP306



Con respecto a las cepas mutantes LP305 y LP306, la producción de cII se detecta solo a los 30 minutos de inducción sin haber inhibición de proteínas bacterianas y la cantidad de cII es menor en las cepas mutantes que en el control N^-/cII^+ (N6188).

DISCUSION

La proteína cII actúa como activador de la transcripción a partir de los promotores P_{RE} y P_I del bacteriófago lambda, siendo esta proteína una de las responsables en el establecimiento del ciclo lisogénico (Wulff y Rosenberg, en "Bacteriophage Lambda"; Ho y Rosenberg, 1982). Trabajos recientes demostraron que la expresión de la proteína cII a altas concentraciones (al estar clonado en un plásmido) podía tener un efecto letal sobre su huésped (Shimatake y Rosenberg, 1981).

En este trabajo se cuantificó el efecto letal del plásmido pOG7 en el cual el gene cII del bacteriófago lambda se encuentra bajo el control del promotor P_I . Como se observa en la Tabla 2, a medida que aumenta el tiempo de inducción de síntesis de la proteína cII, hay una disminución en la fracción celular sobreviviente y esta varía dependiendo de la presencia o ausencia de la proteína N. En presencia de la proteína N, la letalidad se evidencía desde tiempos tempranos (30 minutos) y es del orden de 10,000 veces mientras que, en ausencia de la proteína N, la letalidad es de 1,000 veces y después de 2 horas de inducción. La diferencia observada es debida a la función antiterminadora de la proteína N a nivel de la transcripción (Salstrom y Szybalski, 1978) del plásmido pOG7 contenido en la cepa N^+/cII (N6176). Para la cepa N^-/cII^+ (N6188) el efecto se evidencía unicamente a tiempos tardíos de inducción cuando la proteína cII alcance alta concentración.

Para entender el efecto letal del plásmido pOG7 se procedió a aislar mutantes después del tratamiento con nitroso-gua-

nidina de las cepas N6176 y N6188, que aún en presencia del plásmido pOG7 sobrevivieran a este efecto letal. Se aislaron 11 mutantes de las cuales, 7 provinieron de la cepa N6176 y 4, de la cepa N6188.

Debido a que existía la posibilidad de que la mutación se encontrara en el genoma bacteriano o en el plásmido se procedió a curar a las cepas mutantes y transformarlas con un plásmido silvestre. Para el primer grupo de las 7 mutantes (LP010, LP020, LP030, LP040, LP050, LP060 y LP070) las mutaciones se localizaron en el genoma bacteriano (Tabla 5) pues aún en presencia de la proteína cII silvestre, había sobrevivencia a alta temperatura. Para el grupo de mutantes (LP303, LP304, LP305 y LP306) las mutaciones se localizaron en el plásmido (Tabla 5) pues solo aquellas cepas portadoras del plásmido mutagenizado (LP303, LP304, LP305, LP306, LP333, LP334, LP335 y LP336) eran capaces de sobrevivir a alta temperatura.

Al realizar experimentos de síntesis de β -Galactosidasa como medida indirecta de la proteína cII se observó que para las mutantes LP010, LP020, LP030, LP040, LP050, LP060 y LP070 (Tabla 6) la acción de la proteína cII estaba disminuida debido a que el nivel de enzima era de 3.5 a 20 veces menos que en la cepa silvestre (experimentos realizados a 42°C). La síntesis de β -Galactosidasa en las mutantes aisladas en ausencia de la proteína N fué diferente al grupo anteriormente discutido (Tabla 7) pues su disminución a 42°C era tan solo de 2.65 a 7.26 veces. Para este grupo de mutantes que fueron

transformadas con un plásmido silvestre, los niveles basales a 32°C y 42°C eran similares a los de la cepa silvestre (gráficas 2, 3, 4 y 5).

En la cepa LP333, portadora del plásmido mutagenizado, los niveles de enzima a ambas temperaturas son mayores y en la cinética de producción de β -Galactosidasa (gráfica 2), presenta una pendiente mayor que las cepas N6188 y LP323. Estos resultados podrían sugerir que la proteína cII de esta mutante es más activa. En la cepa LP324 (gráfica 3) los bajos niveles de enzima pueden explicarse debido que se comprobó la pérdida del gene z . Las cepas LP325 y LP326 presentan una activación del promotor p_I por la proteína cII mayor (de 2 a 2.3 veces) que en la cepa silvestre. Porque las pendientes de las curvas en experimentos de cinética de β -Galactosidasa (gráficas 4 y 5) son más altas para ambas cepas.

En el caso de la cepa LP335 portadora del plásmido mutagenizado presenta niveles altos de enzima a ambas temperaturas. Una explicación a este comportamiento sería que a pesar de presentar altos niveles de la proteína cII, esta cepa sobrevive, posiblemente porque la proteína cII perdió su actividad de letalidad y sigue siendo funcional para activar al promotor p_I .

Las cepas LP334 y LP336 presentan bajos niveles de enzima β -Galactosidasa debido a que fué posible aislar los plásmidos pero la producción de β -Lactamasa estaba disminuída (Tabla 8) se sugiere que estas cepas son portadoras de un plásmido en bajo número de copias.

Al realizar experimentos de inmunidad se detectó un cambio a nivel del represor del profago $cI857$ en las mutantes aisladas en presencia de la proteína N (Tabla 9) pues las 7 mutantes no eran lisadas por el fago λcI a alta temperatura a diferencia de la cepa silvestre. Al realizar la misma prueba de inmunidad para las mutantes LP303, LP304, LP305 y LP306, se comprobó que los represores de los profagos se comportaban como la cepa silvestre en cuanto a termosensibilidad (Tabla 10). Se comprobó que las bacterias seguían siendo inmunes al fago λ imm21.

Al analizar la síntesis de proteínas bacterianas (Figura 12) en la cepa N^+/cII^+ (N6176) se observa que a medida que aumenta el tiempo de inducción, la proteína cII se estabiliza causando una inhibición en la síntesis de proteínas bacterianas. En el experimento realizado, la cepa N^+/cII^- (N6048/pOG11) no presenta la banda para la proteína cII ni la inhibición de las proteínas bacterianas, resultados esperados según la observación de Rattray y colaboradores (1982). Para las cepas mutantes LP050 y LP070 (Figura 13) no aparece banda para cII apoyando el hecho de que posee un profago λcI con un represor termolabile que no permite la expresión de los genes de lambda a alta temperatura y por lo tanto no existe inhibición en la síntesis de proteínas bacterianas.

En la cepa N6188 no se alcanza a detectar inhibición en la síntesis de proteínas bacterianas y aparece una banda para la proteína cII menos intensa (Figura 14) que la de la cepa N^+/cII^+ (N6176), estos resultados se explican por la ausencia de la proteína N en la primera cepa. En este caso los efec-

tos de letalidad se detectan a tiempos tardíos (Tabla 2). En las cepas LP305 y LP306 (Figura 14), la proteína cII aparece únicamente a los 30 minutos de inducción y con una intensidad de banda menor que en la cepa N6188. La sobrevivencia de estas mutantes puede deberse a la baja concentración de la proteína cII que no es suficiente para ejercer su efecto letal.

Del conjunto de resultados antes discutidos se desprenden las siguientes ideas a desarrollar.

Para asegurarse que en las mutantes LP303, LP304, LP305 y LP306 la mutación se encuentra en la región de lambda contenida en el plásmido, se sugiere clonar esta región en otro plásmido para verificar si ya no ejerce su función letal.

Por los resultados obtenidos en ensayos de β -Galactosidasa (Tabla 7), parece indicar que hay un cambio en el gene cII de las mutantes por lo que se propone hacer un rescate de este gene en el plásmido por recombinación de un fago y analizar su comportamiento en el establecimiento del ciclo lisogénico.

Así como la proteína cII activa 2 promotores de lambda (P_{RE} y P_I) puede ser que active algún promotor en el genoma bacteriano activando la transcripción de algún mensajero o conjunto de mensajeros que llegue a ser letal y en estas mutantes se perdió o modificó el sitio de reconocimiento de cII por el promotor, impidiendo se lleve a cabo el efecto letal.

También se podría explicar este efecto por tratarse de un plásmido multi-copia, lográndose altas concentraciones para la proteína cII y de alguna manera impide se transcriban los genes bacterianos.

CONCLUSIONES

Al aumentar el tiempo de inducción de síntesis de la proteína cII, hay una disminución en la fracción celular sobreviviente. Esta disminución se ve acentuada al encontrarse en presencia de la proteína N del bacteriófago lambda, donde este efecto es de 10 veces mayor y a tiempos más cortos que al encontrarse en ausencia de la proteína N.

De las 11 mutantes aisladas sobrevivientes al efecto letal de la proteína cII, 7 correspondían a la cepa N6176 y 4, a la cepa N6188. Al realizar estudios de caracterización de las cepas mutantes, se encontró que:

Del grupo de 7 mutantes aisladas en presencia de la proteína N, el represor del profago λ_{cI} , era termoestable a diferencia de la cepa silvestre, por lo que ahora estas cepas mutantes, al ser transformadas con un plásmido silvestre, seguían sobreviviendo a alta temperatura y no eran lisadas por el fago λ_{cI} a alta temperatura. Los genes de lambda en el plásmido estaban reprimidos tanto a baja como a alta temperatura y por esto, los niveles de β -Galactosidasa a 42°C estaban disminuídos en las cepas mutantes a diferencia de la cepa silvestre y al analizar las proteínas bacterianas no se observaba proteína cII ni inhibición en la síntesis de proteínas bacterianas.

Del grupo de 4 mutantes aisladas en ausencia de la proteína N, la mutación se localizó en el plásmido con la proteína cII activa para el promotor p_I y presente al analizar las proteínas bacterianas. Sin embargo, parece indicar que la

proteína cII perdió su función letal al no presentar inhibición en la síntesis de proteínas bacterianas y al parecer únicamente a tiempos tardíos de inducción.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham, J, D. Mascarenhas, R. Fischer, M. Benedik, A.
Campbell y H. Echols, (1980) DNA sequence of regulatory region for integration gene of bacteriophage lambda
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 2477-2481.
- Belfort, M y D. Wulff, (1974). The roles of the lambda cIII gene and the Escherichia coli catabolite gene activation system in the establishment of lysogeny by bacteriophage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 779-782.
- Berman, M.L., L.W. Enquist y T. J. Silhavy, (1982). Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A. pp. 254.
- Campbell, A.M., (1976) How viruses insert their DNA into the DNA of the host cell. Sci. Am. 235-103-113.
- Cheng, E.Y., D.Y. Kwoth, T.J. Kwoth, B.C. Soltvedt y D. Zipser, (1981), Stabilization of a degradable protein by its overexpression in Escherichia coli. Gene 14: 121-130.
- Echols, H. y L. Gree, (1971). Establishment and maintenance of repression by bacteriophage lambda: The role of the cI, cII and cIII proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68: 2190-2194.
- Fiantdt, M., A. Honigman, E.C. Rosenvold y W. Szybalski, (1977), Precise measure of the b2 deletion in coliphage lambda. Gene 2: 289-293.
- Franklin, N.C. y G.N. Bennett, (1979) The N protein of bacteriophage lambda defined by its DNA sequence is highly basic. Gene 8: 107-119.
- Friedman, M. y M.E. Gottesman, (1982) The lytic mode of lambda development. In the 'Bacteriophage lambda'(en prensa).

- Gottesman, M. E. y K. Abremski, (1980). The role of HimA and Xis in lambda site specific recombination. J. Mol. Biol. 138: 503-512.
- Herskowitz, I. y D. Hagen (1980). The lysis-lysogeny decision of phage lambda: explicit programming and responsiveness.
- Ho, Y., M. Lewis y M. Rosenberg, (1982). Purification and properties of a transcription activator: The cII protein of phage lambda. J. Biol. Chem. 257: 9128-9134.
- Ho, Y. y M. Rosenberg, (1982). Characterization of the phage lambda regulatory protein cII. Ann. Microbiol.(Inst. Pasteur) 133: 215-218.
- Hoess, R. H., C. Foeller, K. Bidwell y A. Landy, (1980). Site specific recombination functions of bacteriophage lambda: DNA sequence of regulatory regions and overlapping structural genes for Int and Xis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 77: 2482-2486.
- Hoyt, M. A., D. M. Knight, A. Das, H. I. Miller y H. Echols, (1982). Control of phage lambda development by stability and synthesis of cII protein: Role of the viral cII and host hflA, himA and himD gene. Cell 31: 565-573.
- Jones, M. O. e I. Herskowitz, (1978). Mutants of bacteriophage lambda which do not require the cIII gene for efficient lysogenization. Virology 88: 199-212.
- Lewin, B. (1977). Phage lambda: Infective pathways, in Gene expression. Vol. 3 (John Wiley and sons, eds.) U.S.A. pp. 274.
- Lwoff, A. y A. Gutman, (1950). Recherches sur un Bacillus megatherium lysogéne. Ann. Inst. Pasteur 78: 1-29.

- Maniatis, T., E. F. Fritsch y S. Sambrook, (1982). Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor. New York, U. S. A., pp 545.
- Miller, H. I. y D. I. Friedman (1980). An E. coli gene product required for lambda site specific recombination. Cell 20: 711-719.
- Miller, J. H. (1979). Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A. pp 466.
- Montañez, C., (1982). Aislamiento y caracterización de mutantes del bacteriófago lambda que carecen del retroinhibidor sib. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional, México, pp. 284.
- Oppenheim, A., S. Gottesman y M. E. Gottesman, (1982). Regulation of bacteriophage lambda int gene expression. J. Mol. Biol. 158: 327-346.
- Oppenheim, A. y A. B. Oppenheim, (1978). Regulation of the int gene of bacteriophage lambda: Activation by cII and cIII gene products and the role of the p_I and p_L promoters. Molec. Gen. Genet. 165: 39-46.
- Ptashe M., A. Jeffrey, A.D. Johnson, R. Maurer, B. J. Meyer, C. O. Pabo, T. M. Roberts y R. T. Sauer, (1980). How the lambda repressor and cro work. Cell 19: 1-11.
- Richard, L. F. y A. D. Kaiser, (1971). Control of lambda repressor synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68: 2185-2189.
- Roberts, J. W. (1969). Termination factor for RNA synthesis. Nature 224: 1168-1174.

- Roberts, J.W. y C.W. Roberts (1975). Proteolytic cleavages of bacteriophage lambda repressor induction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 145-151.
- Rosenberg, M, D. Court, H. Shimatake, C. Brady y D.L. Wulff (1978). The relationship between function and DNA secuencia in an intracistronic regulatory region in phage lambda. Nature 272: 414-423.
- Salstrom, J.S. y W. Szybalski (1978). Transcription termination site in the major leftward operon of coliphage lambda. Virology 88: 252-262.
- Sharp, P.A., M-T. Hsu y N. Davidson (1972). Note on the structure of prophage lambda. J. Mol. Biol. 71: 499-502.
- Shimatake, H. y M. Rosenberg (1981). Purified lambda regulatory protein cII positively activates promoters for lysogenic development. Nature 292: 128-132.
- Sussman, R. y F. Jacob (1962). Sur un systeme de repression thermosensible chez le bacteriophage lambda d' E. coli. Compt. Rend. Acad. Sci. 254: 1517-1519.
- Szybalski, E. y W. Szybalski (1979). A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. Gene 7: 217-220.
- Weisberg, R.A., S. Gottesman y M. E. Gottesman (1977). Bacteriophage lambda: Lysogenic pathway. In 'Comprehensive Virology', (ed. H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner), vol. 8 Plenum Press. Nueva York, U.S.A. pp 350.
- Wulff, D. L., M. Beher, Izumi, S., J. Beck, M. Mahoney, H. Shimatake, C. Brady, D. Court y M. Rosenberg (1980).

Structure and function of the cy control region of bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 138: 209-230.

Wulff, D. L. y M. Rosenberg (1982). The establishment of repressor synthesis. In the 'Bacteriophage lambda' (en prensa).

Yarmolinski, M. B. (1971). Making and joining DNA ends. In the 'Bacteriophage lambda', (ed. Hershey A. D.). Cold Spring Harbor Laboratory. New York, U.S.A. pp. 792.