



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "IZTACALA"

30539/88 E-2
3.2.119

UN ESTUDIO SOBRE LA REGULACION
DE LA LISOGENIA DEL
BACTERIOFAGO LAMBDA

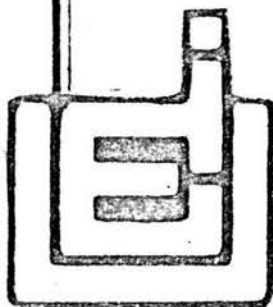
T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

BENITO ESTRADA MENA



1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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).

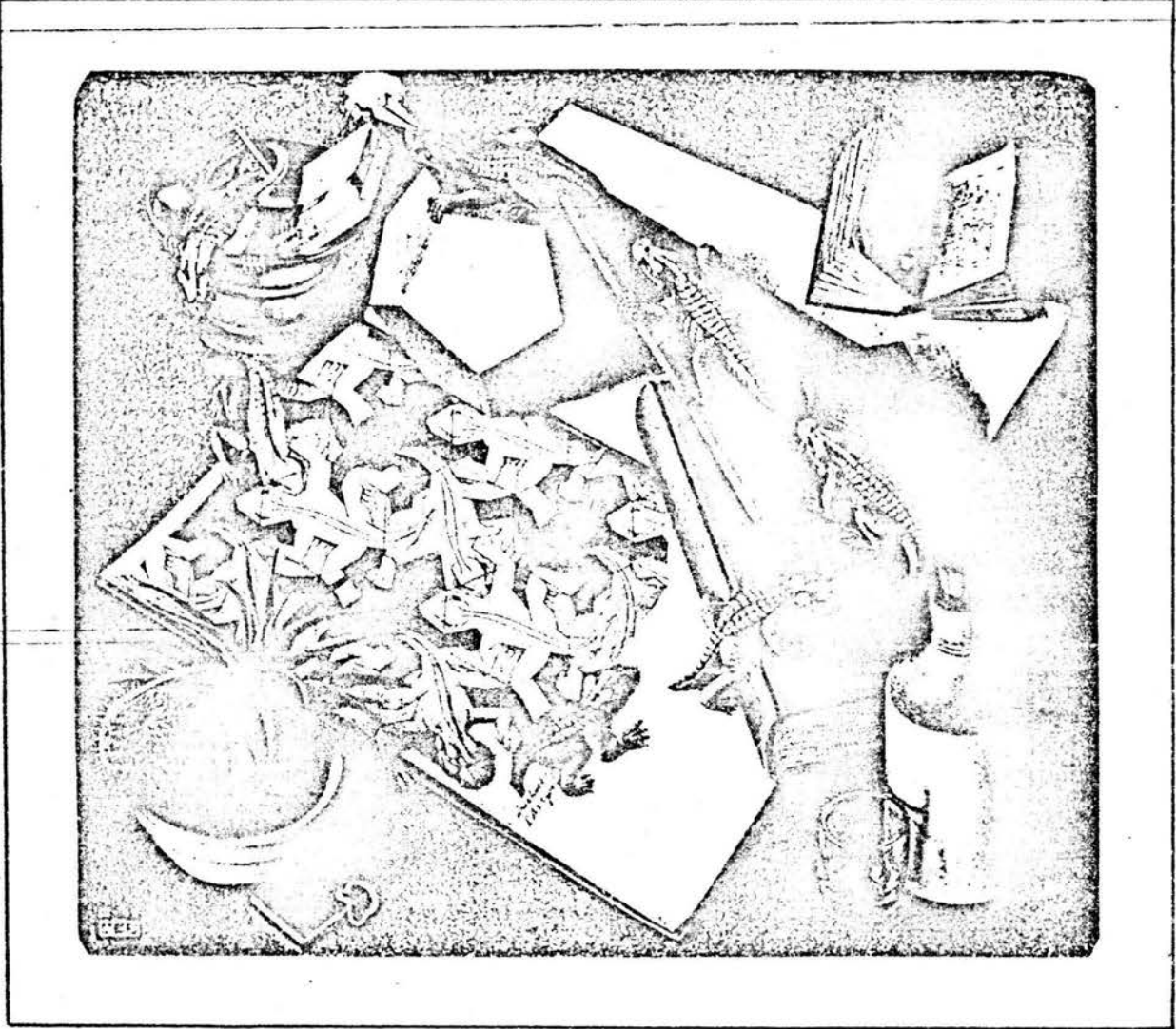
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

"No es el entendimiento humano una luz escueta, sino que recibe influjo de la voluntad y de los sentimientos... Aficionanse los hombres a ciertas ciencias o especulaciones particulares, bien porque se figuran que son ellos los autores e inventores de las mismas, o bien porque a ellos han consagrado mayores trabajos y a ellos están más acostumbrados."

Francis Bacon.

Limbo donde solitario
se transforma lo vivido en polvo.
Páramo sin aire
donde el tiempo
no respira.

Saide Sesin.



Reptiles, de M. C. Escher.

Esta investigación se desarrollo en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la dirección del Dr. Gabriel Guarneros Peña.

A Sergio Vaca Pacheco, quién iluminó y guió mis
primeros pasos en el fascinante mundo de la
ciencia genética.

A mi madre Hortencia por su apoyo incondicional en cualquier actividad que yo emprenda.

Pensad en todos los que nunca se preocuparon sin embargo aún hay algunos que preguntan por qué que tratan de saber, que se atreven a intentar.

Rod McKuen.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Guarneros por haberme permitido embarcarme en esa interesante aventura intelectual que es la genética del bacteriófago lambda, y por la formación de un espíritu crítico.

A José Manuel Galindo, Alison Rattray, Cecilia Montañez, Tere Hernandez, José Paz Ortega, Plinio Antonio Guzman y Luis Kameyama por todos sus comentarios, asistencia técnica y discusiones.

En especial a J. M. Galindo por permitir publicar sus resultados de la tabla II-10.

CONTENIDO

	Pag.
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xi
Abreviaturas	xiii
INTRODUCCION.	1
MATERIAL Y METODOS:	12
Medios de cultivo y soluciones utilizadas.	12
Condiciones de plaqueo.	12
Propagación de fago por infección.	13
Método para la construcción de fagos recombinantes.	13
Complementación por estría para lisogenia.	13
Ensayo de placa roja.	13
Mutagénesis.	14
Ensayo de cruza líticas.	14
Ensayo de superinfección.	15
Frecuencia de lisogenia.	16
Tasa de eclosión.	16
PARTE I. AISLAMIENTO DE MUTANTES CON FENOTIPO Sib^- :	22
RESULTADOS.	
Selección de mutantes con fenotipo Sib^- .	23
Caracterización de mutantes bem^- .	27
a) Prueba de marcadores de las mutantes bem^- .	27
Complementación en $himA^-$ de fagos $bem^- cin^-$.	27
b) Ensayo de placa roja en una cepa $himA^-$ de bem^- .	29
c) Eficiencia de mutantes bem^- para promover recombinação integrativa.	29

d) Frecuencia de lisogenia de mutantes <u>bem⁻</u> .	33
e) Tasa de eclosión de mutantes <u>bem⁻</u> .	35
Mapeo inicial de mutantes <u>bem⁻</u> .	35
DISCUSION.	40
<hr/>	
PARTE II. COMPLEMENTACION INTRAGENICA DE CII.	44
RESULTADOS.	
Ausencia del efecto de <u>sib⁻</u> .	45
La ausencia del efecto inhibitor de <u>sib</u> se debe a un marcador genético del fago.	45
Complementación intragénica entre cII41 y cII68.	50
Efecto de hfl sobre la complementación cII41/cII68.	53
Ausencia de complementación cII41/cII68 para promover represión.	58
Complementación en el ensayo att ² .	60
DISCUSION.	63
BIBLIOGRAFIA.	70
EPILOGO. La lisogenia de las ideas.	78

LISTA DE FIGURAS

	pag.
A-1. Ciclo de vida del bacteriófago lambda.	2
A-2. Mapa genético parcial de lambda.	3
<hr/>	
A-3. Sitios de unión de CI y Cro.	5
A-4. Papel regulador de CII y factores que influyen en su actividad.	7
A-5. La reacción de Integración-Escisión.	9
A-6. Regulación de la expresión del gene <u>int</u> .	11
I-1. El ensayo de placa roja.	24
I-2. Las mutaciones <u>bem</u> ⁻ se localizan a la derecha de att.	37
I-3. Mapeo inicial de mutaciones <u>bem</u> ⁻	39
<hr/>	
II-1. Ensayos de recombinación integrativa.	65
II-2. Una comparación de las secuencias de los promotores pI y pE.	67'

LISTA DE TABLAS

PARTE I. AISLAMIENTO DE MUTANTES CON FENOTIPO sib^- .

TABLA	pag.
I-1. Selección de mutantes bem^- por el ensayo de placa roja.	26
I-2. Fenotipo de mutantes bem^- .	28
I-3. Complementación de mutantes bem^- .	30
I-4. Ensayo de placa roja en una cepa $himA^-$ de fagos bem^- .	31
I-5. Eficiencia de los mutantes bem^- para promover recombinación integrativa.	32
I-6. Frecuencia de lisogenia de mutantes bem^- .	34
I-7. Tasa de eclosión de mutantes bem^- .	36

PARTE II. COMPLEMENTACION INTRAGENICA DE CII

II-1. Ausencia del efecto inhibidor de sib en recombinación integrativa por cruzas líticas ($PP' \times BB'$).	46
II-2. Eficiencia de diferentes mutaciones para eliminar el efecto Sib .	48
II-3. Efecto de sib en el ensayo de superinfección.	49
II-4. Complementación de $cII41$ y $cII68$ para promover recombinación integrativa en cruzas líticas.	51
II-5. Ausencia de complementación $cII41/cII68$ en el ensayo de superinfección.	52
II-6. Efecto de hfl sobre la complementación $cII41/cII68$ en superinfección con fagos $nutL^-$.	54
II-7. Efecto de hfl sobre la complementación $cII41/cII68$ en superinfección con fagos $nutL^+$.	56

II-8. Efecto de <u>hfl</u> sobre la complementación cII41/cII68 en cruas líticas.	57
II-9. Ausencia de complementación en represión.	59
II-10. Complementación en el ensayo de att ² .	61

ABREVIATURAS

DNA: Acido desoxiribonucleico.

RNA: Acido ribonucleico.

gal: galactosa.

mdi: multiplicidad de infección.

fago: ϕ , bacteriófago, virus bacteriano.

ufp: unidad formadora de placa.

NOMENCLATURA

gen: minúscula, ej. cI, cro, himA, hfl, cII.

función ó proteína: Mayúscula, ej. CI, CrO, HimA, Hfl, CIi.

GLOSARIO

cis: Locus que sólo afecta la actividad de secuencias de DNA sobre la misma molécula de DNA, usualmente implica que el locus no puede codificar para una proteína.

trans: Configuración de 2 sitios referidos a su presencia en 2 diferentes moléculas de DNA (cromosomas).

mutación leaky: mutaciones que permiten algún nivel residual de expresión ó de actividad de alguna función.

El profago es una entidad extraordinaria, una molécula debería decir, porque tengo que ser molecular.

~~¿Quién no lo es? El profago es la base de la lisogenia,~~
su esencia, su mera carne; y fué que trabajando sobre lisogenia, me involucré con la molécula del profago.

¿Cómo pasó esto? Las circunstancias están envueltas en las brumas de un pasado remoto. Las ideas se enterraron hace ya tiempo.

...Yo debo haber sido impresionado por el bacteriófago ¿Confesaré que no lo fui? Por lo menos no lo suficiente. Había trabajado sobre lisogenia sin una motivación ulterior. Pero puesto que el profago es una molécula de ácido nucleico, y puesto que estaba estudiando su biología, me convertí poco después en un biólogo molecular. Una posición dudosa, aunque por 1950, los biólogos moleculares futuros no pensaban de ellos mismos el ser tales. La virtud incomensurable de esta etiqueta mágica fué descubierta más tarde. Quizá debería añadir que soy incapaz de decir cuánto me siento molecular, si es que en verdad soy molecular...

"El Profago y Yo"

André Lwoff.

INTRODUCCION

Probablemente el potencial del bacteriófago lambda de "decidir" entre un estilo de propagación lítico ó lisógeno evoluciona en respuesta a las fluctuaciones de los hábitats de su hospedero Escherichia coli. Esta conducta permite al fago responder a condiciones ambientales que le confieran una ventaja selectiva (Miller, 1981; Friedman y Gottesman, 1983).

La respuesta lítica capacita al fago para replicarse, empacar su DNA y producir progenie; esta respuesta es más productiva cuando el hospedero crece en abundancia de nutrientes. El modo lisógeno permite la perpetuación del genoma del fago por asociación estable con el cromosoma bacteriano, sobre todo en condiciones de crecimiento pobre (fig. A-1) (Grozicker et al, 1972; Kourilsky, 1973; para una revisión ver Herskowitz y Hagen, 1980).

En la decisión Lisis/Lisogenia en gran medida influye la multiplicidad de infección (mdi: número promedio de fagos que infectan a una célula). A multiplicidades bajas (0.1) el fago entra en el ciclo lítico; mientras que a multiplicidades altas se favorece el ciclo lisógeno (Kourilsky, 1973).

Teleonomicamente, un número bajo de fagos con respecto al número de bacterias significa un gran suplemento de hospederos para el desarrollo lítico; mientras que un número alto de fagos indica una inminente pérdida de nuevos hospederos para propagarse líticamente (equilibrio en un sistema tipo depredador-presa).

El genoma del fago lambda codifica para 2 proteínas represio-

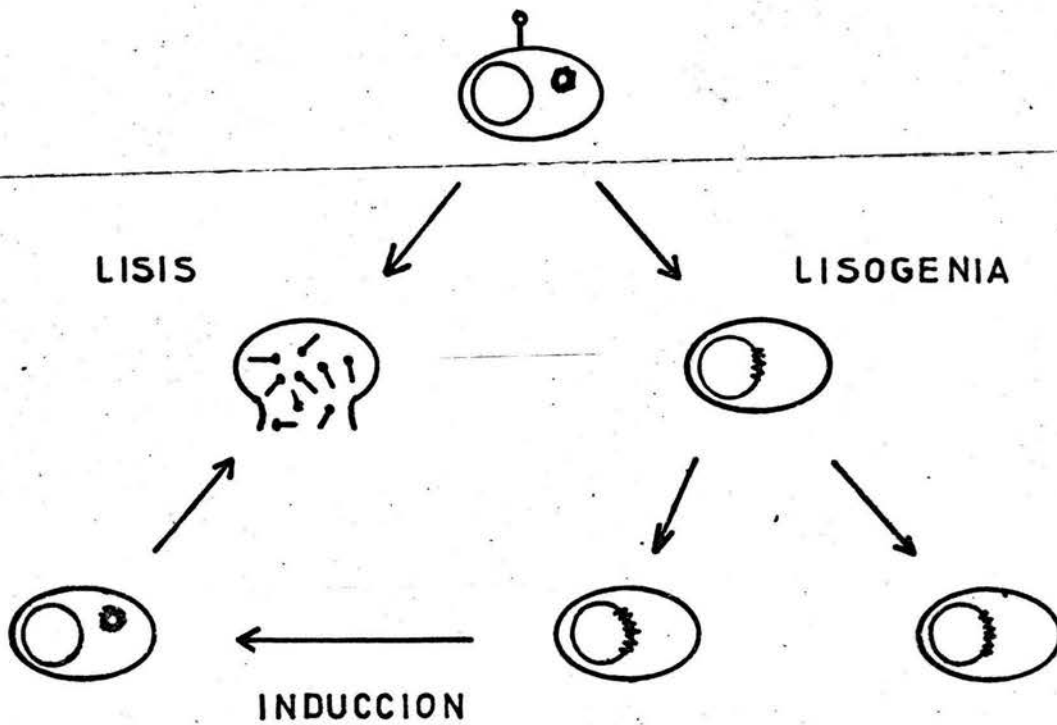


FIG. A-1. CICLO DE VIDA DEL BACTERIOFAGO LAMBDA: En la figura se ilustran las respuestas de la infección de la bacteria Escherichia coli por el fago lambda. En la respuesta lítica el DNA del fago se replica y produce progenie que se libera al medio. En la lisogenia se reprimen las funciones virales y el DNA del fago se asocia al DNA bacteriano. En esta forma se llama profago y es perpetuado en la bacteria por un número indefinido de generaciones. Eventualmente, las funciones del profago se desreprimen, el DNA viral se libera y entra en la respuesta lítica.

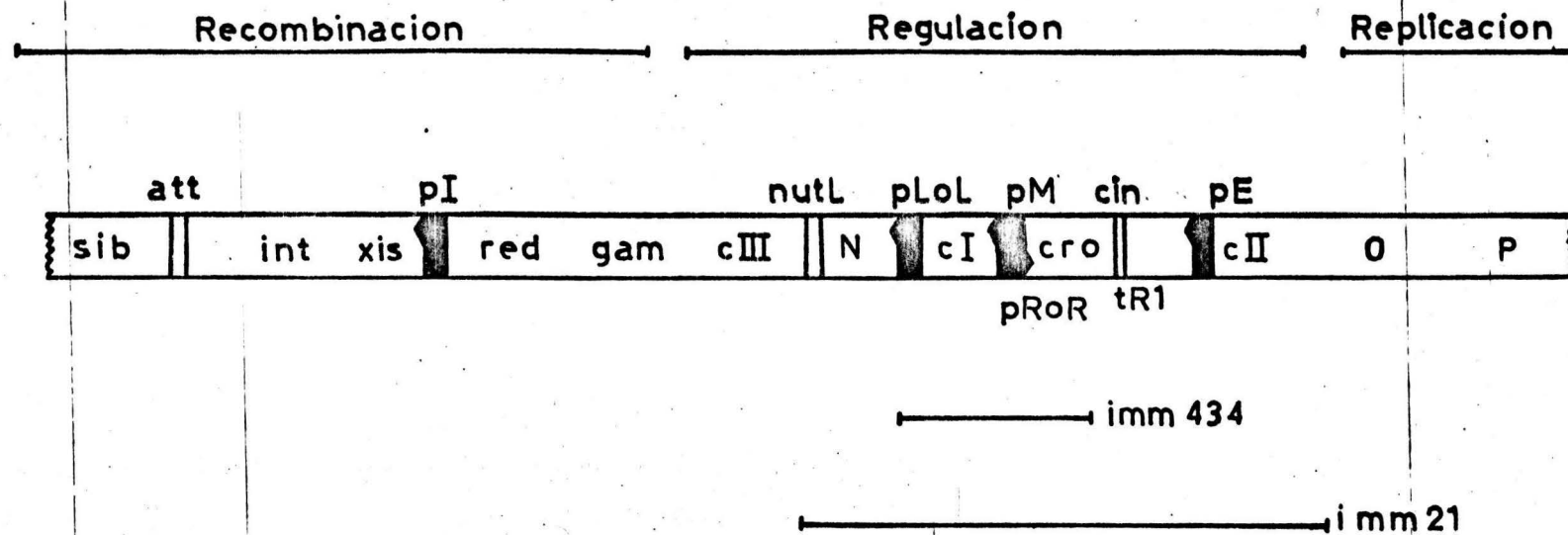


FIG. A-2. MAPA PARCIAL DE LAMBDA. Se muestran las tres regiones principales: Recombinación, Regulación y Replicación (líneas superiores), también se dan las posiciones relativas de los genes, así como los promotores y algunos sitios importantes. Las regiones de inmunidad de los fagos 434 y 21 se muestran con las líneas inferiores del mapa (el dibujo no está a escala).

ras que tienen funciones esenciales, pero que son antagónicas en el tipo de regulación que ejercen para el desarrollo del fago. - El producto del gene cI se requiere para la lisogenia; mientras que el producto del gene cro se necesita durante el ciclo lítico.

El represor CI apaga la transcripción de los genes tempranos que incluyen a cro y adicionalmente enciende la transcripción de cI. Para permitir el desarrollo lítico Cro realiza 2 funciones negativas: Previene la transcripción que estimula CI y abate la de los genes tempranos (Herskowitz y Hagen, 1980).

Ambos represores compiten para unirse a 2 regiones operadoras en el genoma del fago (oL y oR). Cada una de estas regiones - consiste de 3 sitios de unión para los represores, los cuáles tienen diferentes afinidades para cada uno de los sitios. La forma en que se utilizan estos sitios por Cro y CI, sirve como interruptor entre las rutas lítica y lisógena (fig. A-3).

El establecimiento de la lisogenia requiere de la síntesis de 2 funciones del fago: El represor (CI) que inhibe la transcripción de las funciones líticas y la integrasa (Int) que cataliza la recombinación entre el DNA viral y el DNA bacteriano.

La proteína CII (codificada en el genoma del fago) activa - coordinadamente la expresión de los genes del represor (cI) y de la integrasa (int), a partir de los promotores pE y pI respectivamente (figs. A-2 y A-4) (Reichardt y Kaiser, 1971; Echols y Green 1971; Katzir et al, 1976; Jones et al, 1979; Hoess et al, 1980; - Schmeissner et al, 1980; Abrham et al, 1980). Una vez que la re-
presión se establece, la transcripción del gene cI se inicia en -

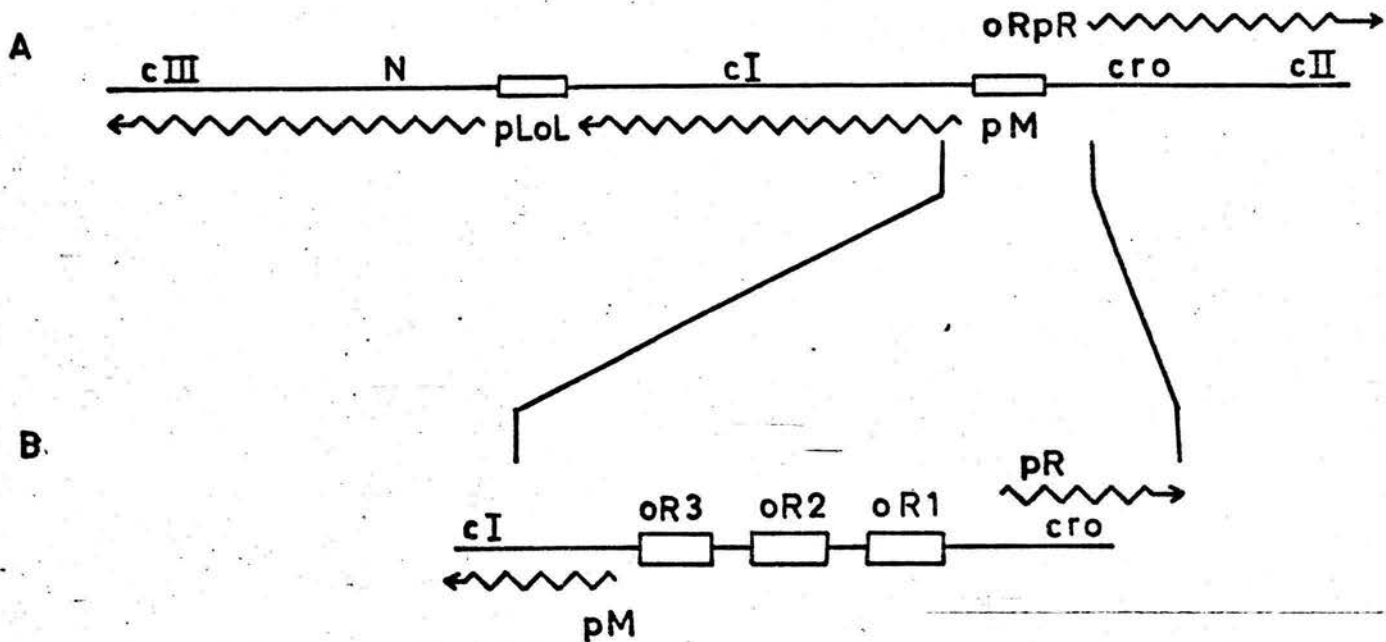


FIG. A-3. SITIOS DE UNION DE CI Y CRO. (A) Una porción del genoma de lambda. Las flechas indican las direcciones y los puntos de inicio de la transcripción de varios genes. *oLpL* y *oRpR* son las regiones operadoras-promotoras izquierda y derecha. (B) Diagrama expandido de la región *oR*. *oR1*, *oR2* y *oR3* son los sitios de unión (de 17 pb de largo cada uno) de *CI* y *Cro*. Los sitios de la transcripción de *pR* y *pM*, que se localizan fuera de los operadores, también se indican. Las afinidades en orden decreciente para los represores son: para *CI* $o1 > o2 > o3$ y para *Cro* $o3 > o2 > o1$.

el promotor pM, que regula positivamente el represor CI (fig. A-2 y A-3) (Ptashne et al, 1976). La proteína CII también ejerce una regulación negativa sobre las funciones líticas (McMacken et al, 1970; Court et al, 1975).

La estabilidad de la proteína CII se controla por los productos génicos de hflA (bacteriano) y de cIII (fágico); La proteína Hfl A facilita la degradación de CII; mientras que CIII protege a CII (Belfort y Wulff, 1973, 1974; Hoyt et al, 1982). La síntesis de CII está bajo control positivo (a nivel postranscripcional) por los productos de los genes bacterianos himA y himD (fig. A-4) (Miller, 1981; Hoyt et al, 1982).

Así CII puede ser la función clave para la separación inicial entre las 2 rutas de desarrollo. La actividad de CII, sólo se manifiesta a multiplicidades de infección altas.

La integración del DNA del fago en el cromosoma bacteriano esencialmente ocurre por el mecanismo propuesto por Campbell (1962). El DNA de λ se circulariza después de la infección y la recombinación se realiza entre sitios específicos att de los DNAs - (PoP', en el fago y BoB', en la bacteria). La reacción de recombinación es mediada por la proteína Int (Zissler, 1967; Gingery y Echols, 1967; Gottesman y Yarmolinsky, 1968). La inducción del profago resulta de la desrepresión y escisión del DNA viral del cromosoma bacteriano (fig. A-5). La reacción de escisión requiere de las proteínas Int y Xis (Gingery y Echols, 1968; Gottesman y Yarmolinsky, 1968; Kaiser y Masuda, 1970; Guarneros y Echols, 1970). Adicionalmente ambas reacciones requieren de los productos bacterianos HimA y Hip (Miller y Friedman, 1980; Miller y Nash, -

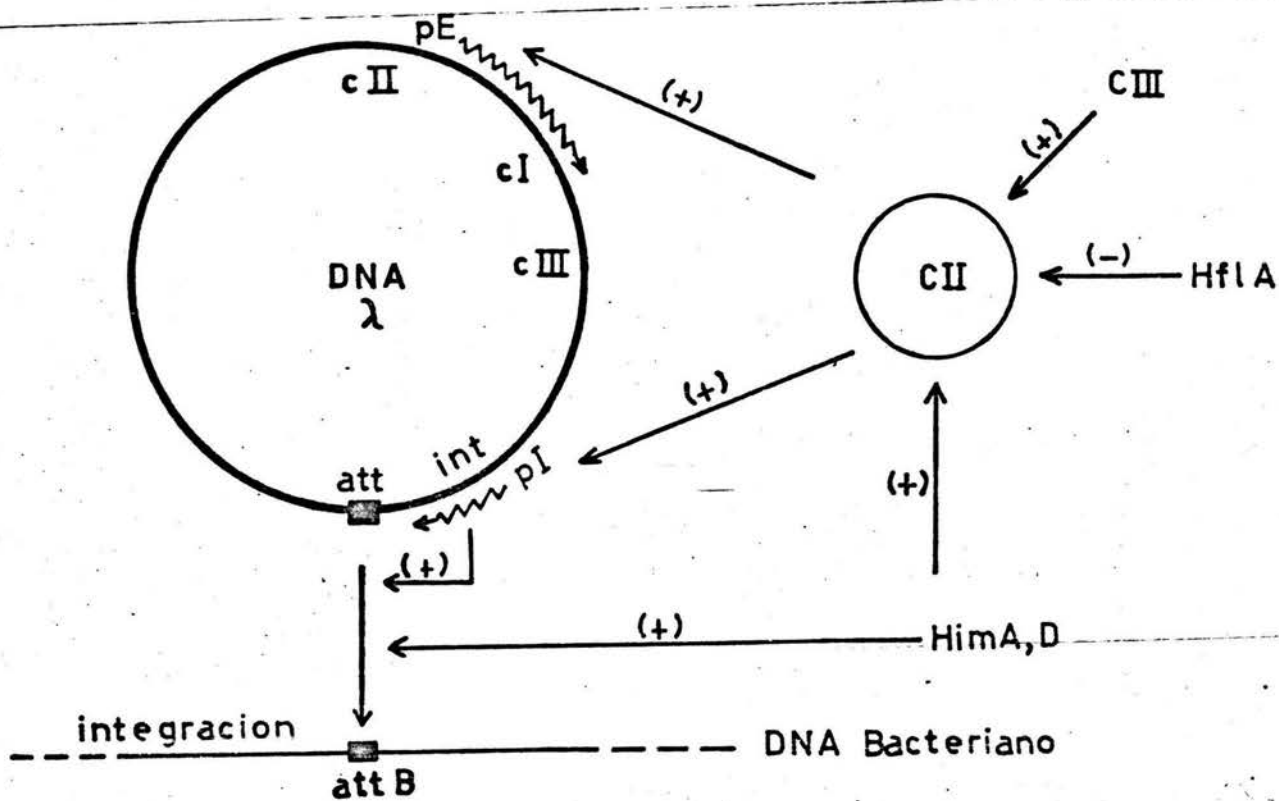


FIG. A-4. PAPEL REGULADOR DE CII Y FACTORES QUE INFLUYEN SU ACTIVIDAD: La proteína CII activa coordinadamente los promotores del represor (pE) y de la integrasa (pI). Existen factores que regulan positivamente (CIII, HimA y HimD) y negativamente (Hfl) la estabilidad de CII. Las proteínas Int y HimA, D actúan en la reacción de integración.

1981).

El gene int además de transcribirse a partir del promotor pI, cuando este se activa por CII (ver más arriba) también se transcribe a partir del promotor pL, cuando este se activa por la proteína N (fig. A-6). Sin embargo, en contraste a los niveles altos de Int que se producen del transcrito de pI, se producen niveles reducidos del transcrito de pL. Esta inhibición es postranscripcional y se efectúa en cis por sib (sitio inhibidor en b) que se localiza distal a int (fig. A-6). A este tipo de inhibición se le ha denominado retroregulación (Schindler y Echols, 1981; Guarneros et al, 1982), que adicionalmente a la región sib requiere de la RNAsaIII, endonucleasa de E. coli que probablemente procesa el RNA_m en sib. Mutaciones en sib ó en RNAsaIII son deficientes en la inhibición.

El sitio sib puede ser vital para la regulación temporal de la lisogenia ya que evita integración temprana en ausencia de represión que podría ser letal para el hospedero. En el estado de profago sib queda separado de int (fig. A-5) por el evento de integración. La inducción se realiza en condiciones Sib⁻, asegurando la expresión de Int y Xis para una escisión rápida del profago (Guarneros y Galindo, 1979; Schindler y Echols, 1981; Guarneros et al, 1982; para una revisión ver Gottesman et al, 1982; Court et al, 1982; Echols y Guarneros, 1983).

En el presente trabajo, se reporta el aislamiento y mapeo preliminar de mutantes que exhiben un fenotipo Sib⁻ en el ensayo de placa roja, pero que se localizan en ó cerca de la región de -

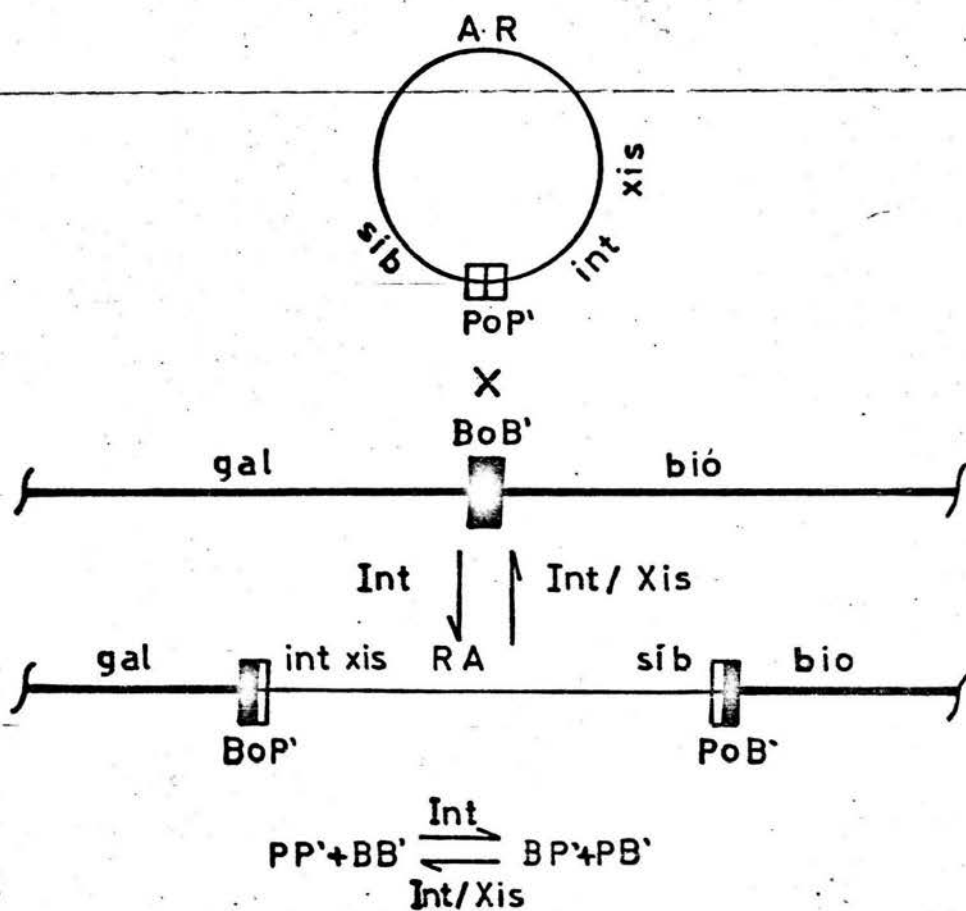


FIG. A-5. LA REACCION INTEGRACION/ESCISION. La recombinación integrativa entre los sitios att de λ (PoP') y de *E. coli* (BoB') es catalizada por la proteína Int y resulta en la integración del DNA fágico (profago). La recombinación escisiva entre los sitios híbridos que flanquean al profago BoP' (izquierda) y PoB' (derecha) es catalizada por Int y Xis y da como resultado la liberación del DNA de λ del cromosoma. Las 2 reacciones de recombinación requieren además los factores de integración del hospedero - (IHF) HimA y Hip. En el genoma del fago, sib esta adyacente al gene int, pero después de la integración quedan separados.

inmunidad cI. Estas mutaciones (bem⁻) sobrepasan la incapacidad de fagos cin⁻ de no formar placas en cepas himA⁻. Se discuten posibles causas de estos efectos (PARTE I).

Por otro lado se presentan evidencias que sugieren que CII68 y CII41 pueden complementar para activar la expresión de pI, pero no de pE. En algunos ensayos el efecto de complementación es dependiente de condiciones hfl⁻. Se discuten posibles explicaciones para la activación diferencial, así como las posibles disparidades en los ensayos utilizados. Por otro lado se confirma la actividad leaky de CII68 que podría ser importante en la complementación con CII41 (PARTE II).

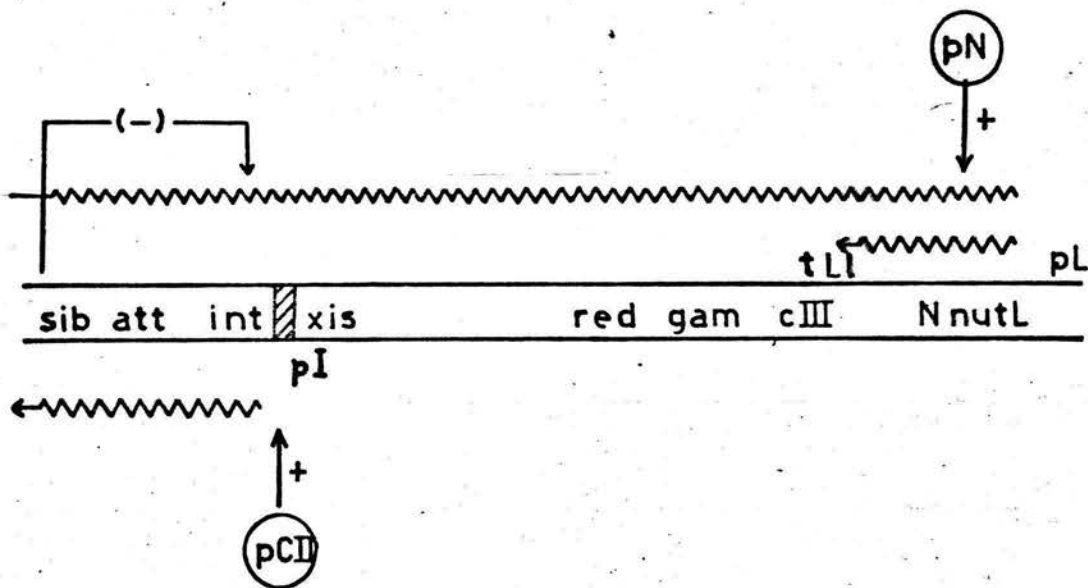


FIG. A-6. REGULACION DE LA EXPRESION DEL GENE *int*. Después de la infección; la transcripción (líneas onduladas) iniciada en *pL* - termina en *tL1*. La proteína N elimina la terminación (+) prolongando el transcrito hasta la región *b*. El sitio *sib* previene (-) la traducción del RNA_m de *int*. Posteriormente, la proteína CII, activa la transcripción (+) de *pI*. Este transcrito incluye *int*, pero no *xis*. *sib* no reduce la traducción de *int* del transcrito de *pI*.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias: Las cepas bacterianas y su genotipo relevante se enlistan en la tabla A.

Bacteriófagos: Las mutaciones fágicas utilizadas en diferentes combinaciones se dan en la tabla B.

Medios de cultivo y soluciones utilizadas:

TØ (bacto triptona 10 g, NaCl 2.5 g, 2 ml de NaOH al 2%, agar 10 g, aforar a 1000 ml de H₂O); TØ suave (idéntico a TØ, excepto que se agregó 6 g/lit de agar); LB (Luria: triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, NaOH al 2% 4.8 ml, aforar a 1000 ml de H₂O. En caso de la preparación de cajas se agregaron 15 g de agar); Tet-C (triptona 10 g, NaCl 5 g, agar 11 g, esterilizar y añadir 2.5 ml de cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolium (TTC) al 1%, 50 ml de D-galactosa al 20%, aforar a 1000 ml de H₂O); EMBO (agar EMB 27.5 g, aforar a 1000 ml de H₂O); TB (triptona 10 g, NaCl 5 g, aforar a 1000 ml de H₂O); TB-D (TB + 0.2% maltosa); SM (NaCl 5.85 g, gelatina 0.5 g, H₂O 480.5 ml, ajustar el pH a 7.4 con 0.2 ml de HCl 1N, esterilizar y - agregar 5 ml Tris 1M pH 7.4, MgSO₄ 1M 2.5 ml). En todos los medios - preparados se utilizó H₂O destilada y la esterilización se efectuó - en autoclave por 20 min a 121.C, 15 p.s.i..

Condiciones de plaqueo: Aliquotas de una suspensión de fago (en SM) se mezclaron con 0.1 ml de un cultivo bacteriano de toda la noche - (a 32 °) y se dejó adsorber de 10-20 min a temperatura ambiente. 2.0-2.5 ml de TØ suave fundido se añadieron y el contenido se distribuyó en una placa de agar (ó el medio que se indique).

Propagación de fago por infección: En un matraz Erlenmeyer de 125 ml se colocaron 5 ml de LB, 0.5 ml de la bacteria adecuada (generalmente Q1) que había sido crecida toda la noche en TB-D, 50 ul de CaCl_2 1M, y una placa lítica del fago por propagar. Se incubó a 39° hasta obtener lisis (de 3 a 5 hrs., en agitación); se agregó aproximadamente ~~10 gotas de cloroformo y se agitó por 15 min.~~ Se centrifugó para bajar los restos celulares (10K rpm, 10 min). El sobrenadante se tituló en la bacteria adecuada (utilizando diluciones en SM 10^{-6} , 10^{-7}). Se obtienen títulos de un rango de 10^9 a 10^{10} fagos por ml dependiendo del genotipo fágico).

Método para la construcción de fagos recombinantes: Se creció la cepa adecuada hasta una D.O._{590nm} = 1 en TB-D ($\sim 4 \times 10^8$ cel/ml). En un tubo se colocaron $\sim 10^8$ ufp de cada fago progenitor en la cruza (ó la mdi deseada); se agregó 0.1 ml del cultivo bacteriano. Se adicionó MgSO_4 para dar una concentración final de 10^{-2} M, y se llevo a un volumen constante con TB (no mayor de 0.5 ml). Se permitió la adsorción durante 20 min a temperatura ambiente, después de la cuál se le agregó 5 ml de TB y se incubó en agitación por 90 min a 37°C. Se le agregaron unas gotas de cloroformo y se agitó por 15 min. Se tituló el lisado de la recombinación sobre la bacteria indicadora adecuada.

Complementación por estria para lisogenia: Se prepararon suspensiones de 1×10^7 fagos/ml. Alícuotas de 20 ul de uno de los fagos se corrieron a lo largo de un tapiz bacteriano en una placa de agar para formar una estria; después de haberse secado ligeramente la estria de la suspensión de fago, una alícuota de 10 ul del fago a complementar se corrió en ángulo recto a la estria anterior. Las cajas se incubaron a la temperatura adecuada.

Ensayo de placa roja: 0.1 ml de un cultivo bacteriano crecido a 32° toda la noche, de las cepas de placa roja (137 ó K713, que llevan insertado un profago críptico en galT) se mezcla con una suspensión conteniendo de 100 a 1000 ufp de los fagos a examinar, se permite la adsorción por 15 min, se agrega 2.5 ml de TØ suave y se vacia a pla-

cas de gal-TTC (Tet-C). Después de que las placas se han secado, se incuban a 34°C por 18-24 hrs. Alternativamente en un tapiz bacteriano (con las cepas mencionadas anteriormente sobre las placas de Tet-C) se estrian suspensiones de los fagos a examinar con un palillo estéril (ver Enquist y Weisberg, 1976).

Mutagénesis: Se utilizó la cepa que contiene el alelo mutador mutD5 (Fowler et al, 1974) que promueve mutaciones por crecimiento del fago en esta cepa. La mutagénesis del fago HindIIIred114cI857cinIcII68 Se realizó por una modificación del método de Enquist y Weisberg (1976). Se creció la cepa mut D5 en LB toda la noche. Al día siguiente se tomó 0.1 ml de este cultivo y se mezcló con una concentración de suspensión de fagos adecuada para obtener placas aisladas. La mezcla se plaqueo en TØ (ver condiciones de plaqueo). Aproximadamente se obtuvieron el 1% de placas claras. Se tomaron 100 placas turbias aisladas y se resuspendieron en 1 ml de SM y se probaron por el método de selección de placa roja. Posteriormente se tomaron las placas que se comportaban como Sib⁻ y se purificaron 2 veces por estria en la cepa de placa roja con los controles respectivos. Al final se eligieron 21 candidatos de placas diferentes. La mutagénesis con mut D5 genera transiciones, transversiones y en menor frecuencia adición de bases.

Ensayo de cruza líticas (PP' x BB'): La recombinación sitio-específica se llevo a cabo por la técnica descrita por Guarneros y Echols (1973): La cepa indicada se creció (generalmente S601recA⁻) a una D.O._{590nm} = 1 (4×10^8 cel/ml). 0.1 ml de este cultivo se infectó con 4×10^8 de cada fago progenitor en la cruz. Se adicionó MgSO₄ a una concentración final de 0.01 M en un volumen total de 0.5 ml (se ajusto con TB). Después de 15 min de adsorción a temperatura ambiente, las células infectadas se diluyeron 1:100 en TB-D precalentado a 37°C y se agitaron por 90 min a 37°C. Se terminó la lisis por adición de 5 gotas de cloroformo. Los porcentajes de recombinación se estimaron por plaqueo en Tet-C de diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en las cepas 198recA gal⁻ (donde sólo crecen el progenitor PP' y el recombi-

nante BP', que forma placas rojas porque es transductor de gal) y en la cepa S165(P2)gal⁻ (donde sólo plaquean el progenitor BB' que da - placas rojas por gal y el recombinante BP' que da placas blancas). Aunque en ambas cepas se obtienen porcentajes de recombinación similares (recombinación recíproca) en las tablas de resultados sólo se dan los porcentajes estimados en la cepa 198recA⁻, donde es más fácil distinguir los recombinantes.

Ensayo de Superinfección: Este ensayo, diseñado por Guarneros y Galindo (1979) mide la actividad de la integrasa por escisión de un profago con los sitios PP' y BB'. La cepa SA731(int2red114cI857cII41gal8) se creció en TB-D toda la noche a 32°C. Una alícuota del cultivo nocturno se diluyó 1:50 en TB-D y se creció a 32°C hasta una D.O._{590nm} = 1 (4x10⁸ cel/ml). En tubos Eppendorf (de 1.5 ml) se prepararon las mezclas de adsorción, agregando el fago auxiliar a una mdi - de 10 y MgSO₄ hasta una concentración final de 0.01 M. Las mezclas - de adsorción se llevaron a un volumen constante con TB. Se les adici - onó 0.1 ml del cultivo a D.O. = 1, y se permitió la adsorción por 3 - min a temperatura ambiente y 17 min a 0°C (hielo-agua). Las células infectadas se diluyeron en 1 ml de TB frío y se centrifugo por 4 min (el sobrenadante se puede guardar para calcular el % de adsorción - titulando en una cepa Su3gal⁻ (imm434). La pastilla se resuspendió en 0.5 ml de TB-D frío y se pasó a un matraz Erlenmeyer de 125 ml conte - niendo 4 ml de TB-D frío. El tubo se lavó con 0.5 ml de TB y se paso al matraz. Se tomó una alícuota de 0.1 ml para medir centros infecti - vos. Estos se calcularon restando las placas resistentes a cloroformo (∅ libre, dilución 10⁻³) del total de las unidades formadoras de placas (pt, dilución 10⁻⁴) en la cepa Su3gal⁻ (imm434). El matraz se incubó en agitación a 39°C por 85 min. Se adicionaron 5 gotas de - CHCL₃ para completar la lisis celular. Se titularon de las dilucio - nes 10⁰-10⁻³ en Tet-C en la cepa Su3gal⁻ (immC1) donde las placas ro

jas (fago transductor de gal) representan el fago escindido por Int y las placas blancas son gal⁻. También se plaquéó la dilución 10⁻⁵ en la cepa Su3(imm434) para determinar la tasa de eclosión del fago auxiliar (en T₀). El número de fagos gal⁺, gal⁻ y del auxiliar (todos en 5 ml) se dividió entre el número de centros infectivos (en 5 ml) para obtener el número de cada tipo de fago por célula infectada. El fago gal⁺ representa profagos escindidos por recombinación - integrativa, y refleja la actividad de la integrasa (índice de integración). Dado que los otros 2 valores permanecen constantes, en las tablas sólo se da el índice de integración.

Frecuencia de Lisogenia: Las células (normalmente S165) se crecieron a D.O._{590nm} = 1 y 0.1 ml de este cultivo se infectó con una mdi de 10 de los fagos a examinar con una concentración final de 0.01 M de MgSO₄ y todos los tubos se llevaron a un volumen constante. Se permitió la adsorción por 30 min a temperatura ambiente y después se centrifugó por 4 min en la microfuga Eppendorf. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de TB-D. Se tomó una alícuota para calcular centros infectivos (ver superinfección) en S165. Se incubó a 32°C (para fagos cI857) por 90 min (incluyendo un control sin infectar). Se espatularon diluciones para obtener colonias bacterianas aisladas (10⁻² y 10⁻³) en cajas LB ó EMBO. Se probaron 100 colonias por estria para inmunidad con fagos cI⁻ y imm434cI⁻ (para obtener el número de lisogenas y de resistentes). A las células cI-resistentes, se les resta el número de células imm434-resistentes y este número se divide entre los centros infectivos para obtener la frecuencia de lisogenia.

Tasa de eclosión: Se creció la bacteria adecuada en TB-D a 32°C hasta una concentración de 4x10⁸ cel/ml (D.O._{590nm} = 1). Se adicionó a 0.1 ml del cultivo 4x10⁸ fagos y MgSO₄ a una concentración final de 0.01 M. Se permitió la adsorción por 3 min a temperatura ambiente y

por 17 min en frío (hielo-agua), se llevo a un volumen de 1 ml y se centrifugó por 4 min en la microfuga Eppendorf. La pastilla fué re-suspendida en 1 ml de TB-D y se diluyó en 5 ml de TB-D. Se tomó una alícuota para calcular centros infectivos (ver superinfección) en S165. El resto del cultivo se incubó en agitación a 39°C durante el tiempo indicado en cada experimento, al final se agregó cloroformo para completar la lisis celular y se tituló en S165 ó Q1. Los valores se dan como tasa de eclosión por centro infectivo.

TABLA A

Cepas Bacterianas

Nombre ó clave	Características	Referencia ó fuente
Q1	<u>SupE</u> , supresor de mutaciones ambar.	Signer y Weil, 1968.
S601	<u>recA⁻</u> , <u>gal⁻</u> ; deficiente en recombinación - generalizada.	Este laboratorio.
LE 289	<u>SupF</u> , supresor de mutaciones ambar, lisógena para el fago críptico (λ [int-F][Δ]) en <u>galT</u> . Para el ensayo de placa roja.	Enquist y Weisberg, 1976.
M72 (<u>imm434</u>)	<u>supF</u> , supresor de mutaciones ambar, <u>gal⁻</u> y - lisógena para un profago con inmunidad 434.	Guarneros y Galindo, 1979.
M72 (<u>immcI</u>)	<u>supF</u> , supresor de mutaciones ambar, <u>gal⁻</u> y - lisógena para un profago con inmunidad .	Guarneros y Galindo, 1979.
M72 (<u>imm21</u>)	<u>supF</u> , supresor de mutaciones ambar, <u>gal⁻</u> y - lisógena para un profago con inmunidad 21.	Guarneros y Galindo, 1979.
GG 235(SA731)	Lisógena para el profago <u>int2red114cI857cII4lgal8</u> , <u>recA⁻</u> .	Guarneros y Galindo, 1979.
LE 30	Cepa con el gene mutador mut-D5.	Fowler <u>et al</u> , 1984.
GG198	<u>supF</u> , supresor de mutaciones ambar, <u>gal⁻</u> <u>recA⁻</u> , <u>lac Δ</u> .	Este laboratorio.

Nombre ó clave	Características	Referencia ó fuente
N2668	<u>ligts</u> , impide el crecimiento de fagos <u>red</u> ⁻ .	Colección NIH.
GG414	Derivada <u>hfl-1</u> de SA731 (<u>imm434</u>). Ver GG235.	Este laboratorio.
S165	Su ⁻ .	Colección NIH.
S165 <u>hfl</u> ⁻	Derivada <u>hfl-1</u> de S165	Este laboratorio.
K5185	N99 <u>himA</u> 082:Tn 10. Delección en el gene <u>himA</u> que inhibe la recombinación integrativa.	Miller, 1981.
K936	<u>himA</u> 42, inhibe la recombinación integrativa.	Miller y Friedman, 1980.
K173	Derivada <u>himA</u> 42, de LE289 (de placa roja).	Miller, <u>et al</u> , 1980.
K95	<u>nusA</u> ⁻ , inhibe la expresión de la función N de .	Este laboratorio.
hip ⁻	inhibe la recombinación <u>integrativa</u> y al igual que todas las cepas <u>himA</u> , impide el crecimiento de fagos <u>cin</u> .	Colección NIH.

TABLA B

Mutaciones del fago λ usadas

Mutación	Características	Referencia ó fuente
<u>cI857</u>	Represor termosensible de λ .	Sussman y Jacob, 1962.
<u>cII68</u>	Mutación de sentido equivocado de <u>cII</u> .	Kaiser, 1957.
<u>cII41</u>	Mutación ambar de <u>cII</u> y que es suprimible por <u>supF</u> .	Belfort, 1975.
<u>bio11</u>	Sustitución del operón <u>bio</u> , que elimina los genes <u>int</u> , <u>xis</u> , <u>red</u> y <u>gam</u> de λ .	Manly, <u>et al</u> , 1969.
<u>bio10</u>	Sustitución del operón <u>bio</u> , que elimina los genes comprendidos entre PP' y <u>cIII</u> .	Signer <u>et al</u> , 1969.
<u>redB114</u>	Mutación en <u>redB</u> que altera la función de recombinación generalizada del fago.	Shulman, <u>et al</u> , 1970.
<u>sib1,2,3</u>	Mutaciones en <u>sib</u> que eliminan la retroinhibición de <u>int</u> .	Montañez, 1982; este laboratorio.
<u>bem⁻</u> (1-21)	Mutación que en conjunto con <u>cin⁻</u> , hace a los fagos Sib ⁻ en "placa roja" y pueden crecer en cepas <u>himA</u> .	Estrada B.; este trabajo.
<u>nutL44</u>	Mutación puntual que no permite la prolongación del mensaje de pL.	Salstrom y Szybalski, 1978.
<u>cin1</u>	Mutación en la región 'y' que incrementa la sogenización de mutantes <u>cY⁻</u> , <u>cII⁻</u> y <u>cIII⁻</u> . No crece en <u>himA</u> -	McDermitt, et al, 1976.

Mutación	Características	Referencia ó fuente
<u>cnc1</u>	Revierte el efecto de la mutación <u>cin-1</u> .	Wulff, 1976.
<u>ind203</u>	Mutación que hace al represor CI no inducible.	Jacob y Campbell, 1959.
<u>inth3</u>	Mutación que incrementa la actividad de Int, aún en <u>himA</u>	Miller, <u>et al</u> , 1980.
<u>gal8</u>	Sustitución de la región b2 de λ por el operador <u>gal</u> de <u>E. coli</u> .	Feiss, <u>et al</u> , 1972.
<u>Oam29</u>	Mutación ambar en el gene de replicación <u>O</u> .	Campbell, 1961.
λ <u>imm434</u>	Híbrido que contiene la región de inmunidad del fago lambdaoide 434 (<u>oL</u> hasta <u>cro</u>) y el resto de λ .	Kaiser y Jacob, 1957.
λ <u>imm21</u>	Híbrido que contiene la región de inmunidad del fago lambdaoide 21 (<u>N</u> hasta <u>cII</u>) y el resto de λ .	Liedke-Kulke y Kaiser, 1967.
HindIII (E,F)	Delección de los fragmentos de DNA, E y F producidos por la enzima de restricción HindIII.	Colección NIH.
<u>b2</u>	Delección del 12% de DNA en la región b de λ . Elimina <u>sib</u> .	Kellenberger <u>et al</u> , 1961.



Mosaico II, de M. C. Escher.

PARTE I

"AISLAMIENTO DE MUTANTES CON FENOTIPO Sib⁻"

"La naturaleza es diferentemente sutil que nuestros sentidos y nuestro espíritu; de suerte que todas - nuestras bellas meditaciones y especulaciones, todas las teorías por el hombre imaginadas, son cosas peligrosas, a menos, sin embargo, que estemos sobre aviso".

Francis Bacon.

RESULTADOS

SELECCION DE MUTANTES CON FENOTIPO Sib⁻:

El objetivo de esta parte fué el aislamiento y caracterización de mutantes con fenotipo Sib⁻ distintas a las aisladas previamente (Montañez, 1982) que ayudaran a entender la regulación de la integración en el bacteriófago lambda.

Para el aislamiento de las mutantes se utilizó el método de selección denominado ensayo de placa roja desarrollado por Enquist y Weisberg (1976) el cual se basa en la escisión dependiente de Int y Xis de un profago críptico (ver fig. I-1). Dado que la reacción de escisión es dependiente de los niveles de Int y Xis del fago infectante es factible el poder obtener diferencias entre fagos sib⁺ y sib⁻. Así las placas formadas por los fagos sib⁻ serian rojas en un tiempo de incubación menor que las de los fagos sib⁺, debido a los niveles mayores de Int, como consecuencia de la alteración del retroinhibidor.

Existen evidencias que sugieren que que sib no tiene efecto (ó este es muy discreto) sobre la expresión de xis, el gene adyacente a int (fig. A-2) y cuyo producto tambien se requiere para la reacción de escisión (Shindler y Echols, 1981; Ortega, 1983). Así las diferencias sólo dependerian de los niveles de integrasa.

Para el ensayo de placa roja se usaron fagos con los marcadores genéticos HindIIIred114cI857cin1cII68 (sib⁺ ó sib⁻).

La mutación cII68 (cII defectiva) se utiliza para evitar la expresión de int a partir de pI, para que la expresión de int sólo este dada a partir de pL, que es la condición para el estudio de sib (Guarneros y Galindo, 1979). Pero debido a que CII tambien regula positivamente la expresión de cI (gene del represor) es necesario utilizar la mutación cin1 que crea un promotor para cI independiente de la regulación de CII (Wulff, 1976); de esta forma se obtiene represión en condiciones cII⁻. La mutación red114

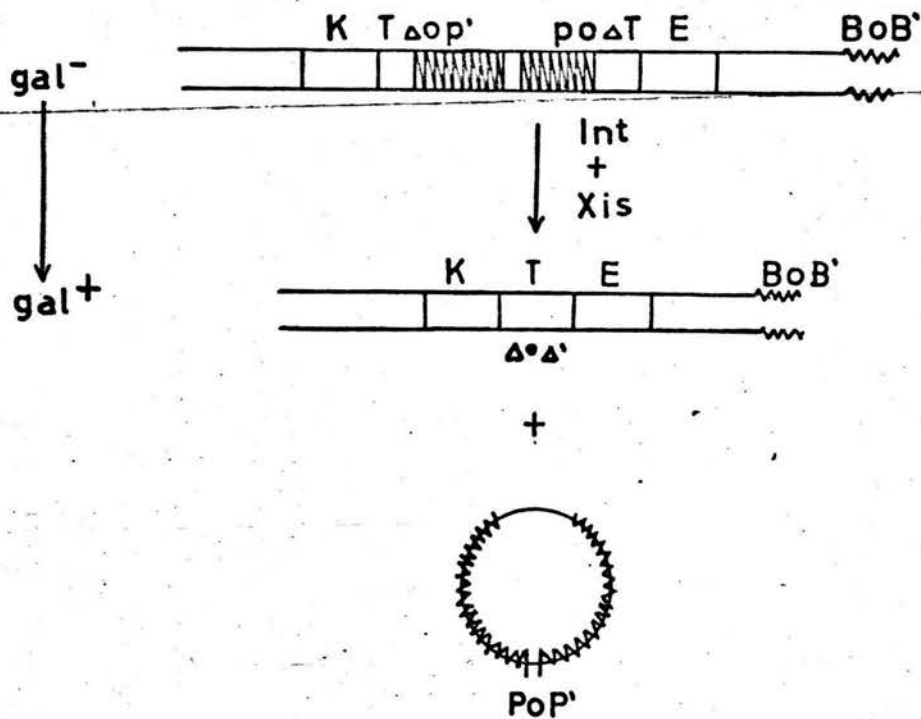


FIG. I-1. EL ENSAYO DE PLACA ROJA. Una cepa de *E. coli* (de "placa roja") con un profago críptico (segmento corto del DNA del fago) en el gene T del operón gal le confiere un fenotipo Gal^- (mutación por inserción). Si a esta bacteria se le infecta con fagos que puedan proporcionar las funciones Int y Xis (proteínas indispensables para la escisión sitio-específica del fago) el profago críptico se escinde del genoma bacteriano, dejando un operón Gal^+ funcional. Si además el fago infectante reprime sus funciones líticas para la obtención de lisógenas, la reversión de galT puede ser detectada por formación de placas rojas (en un medio indicador que reacciona al cambio de pH, por utilización de galactosa. Ver texto para más detalle).

reduce la posibilidad de que la escisión del profago en el ensayo se de por un mecanismo distinto al sitio-específico. La delección HindIII, que elimina el 8% del DNA del fago (esta región, deja un espacio de 250 pb entre esta y el sitio de inserción att, donde se localiza sib) se utilizó con el fin de que el mapeo genético - de posibles mutantes en esa región fuera más fácil.

Como se predijo inicialmente, al efectuar el ensayo de placa roja con fagos sib⁺ y sib⁻ se observaron diferencias apreciables entre ellos (tabla I-1, líneas 1 a 4). A las 20 hrs de incubación se obtiene una diferencia marcada en el color de las placas; para los casos sib⁻ se observan rojas, mientras que para el caso sib⁺ se observan blancas y turbias (un fenotipo similar a los casos - sib⁻ se encontró para el fago b2Δ ; datos no mostrados).

Es interesante remarcar que entre los fagos sib⁻, el caso - sib₃ se destacó por dar placas rojas con una intensidad de color mayor (son las primeras en que se visualiza un matiz rojo). La interpretación de este hecho no es clara, ya que en otros ensayos más sensibles que miden la actividad de Int no existen diferencias entre las mutaciones sib⁻ (Montañez, 1982; Guarneros et al, - 1982; Galindo, com. per.; Estrada , B.).

Con el ensayo de placa roja como método de selección se aislaron 21 mutantes derivados de la mutagénesis por plaqueo en la cepa MutD del fago HindIIIred114cI857cinlcII68 (para más detalle ver Material y Métodos). Todas las mutantes (llamadas "bem" por - "b effect mask") se comportan como el fago sib₃ (tabla I-1, línea 5).

Tanto en los casos sib⁻ como en bem⁻ se observa un rango del 70-90% de placas rojas a las 24 hrs; a tiempos más prolongados de incubación el porcentaje se incrementa, pero las diferencias entre sib⁺ y sib⁻ ó bem⁻ desaparecen.

TABLA I-1

SELECCION DE MUTANTES bem⁻ POR EL ENSAYO
DE PLACA ROJA

FAGO	FENOTIPO
sib ⁺	blanco
sib1	ROJO +
sib2	ROJO +
sib3	ROJO ++
bem ⁻	ROJO ++

Se infectó la cepa del ensayo de placa LE289 con los fagos indicados (todos los fagos llevan los marcadores HindIIIred114-cI857cinlcII68). La incubación se realizó por 20 hrs a 34°C. Se probaron 21 candidatos bem⁻ aislados independientemente. Las - cruces denotan la intensidad de color de las placas rojas.

CARACTERIZACION DE MUTANTES bem^- .

a) PRUEBA DE MARCADORES DE LAS MUTANTES bem^- :

Para determinar si las mutantes bem^- sufrieron algún cambio en los marcadores genéticos del bacteriófago original, se examinaron por plaqueo en diferentes cepas indicadoras. Los resultados más relevantes se muestran en la tabla I-2. Se observó que las mutantes bem^- a diferencia del progenitor bem^+ (HindIIIred114cI-857cin1cII68) plaqueó en cepas $himA^-$ (ó hip^-); algo similar se observó en cepas $nusA^-$. Dado que una característica de fagos que portan la mutación $cin1$ es no formar placas en una cepa $himA^-$ (ó hip^-) los resultados de la tabla sugieren pérdida de esta mutación (reversión) ó adquisición de otra mutación que sobrepase el efecto de cin^- (pseudoreversión). Las mutantes bem^- exhibieron un fenotipo turbio en las cepas Q1 y aún en la cepa $himA^-$ (hip^-) resultado que indicaría síntesis de represor. Esta observación podría apoyar una pseudoreversión más que una reversión. Otra posibilidad que parece menos probable es una doble reversión: cin^- a cin^+ y de cII^- a cII^+ . Un fago cII^+ daría un fenotipo similar a sib^- en el ensayo de placa roja y crecería en una cepa $himA^-$ (aunque formaría placas claras).

Con el fin de examinar la posibilidad de que las mutantes fueran cII^+ se realizaron pruebas de complementación como las descritas en la tabla I-3. Los resultados indican que las mutantes son cII^- (línea 5) al igual que el progenitor bem^+ (línea 4).

COMPLEMENTACION EN $HimA^-$ DE FAGOS cin^- :

Para tratar de aclarar acerca de los efectos de la mutación $cin1$ en $himA^-$ y de su relación con bem^- se realizaron las pruebas de complementación presentadas en la columna de la derecha de la tabla I-3. Se puede observar que el fago $cin1cII68$ no inhibe el crecimiento del fago $cI857cII68$ (a 32° y 42°C) indicando que el efecto de $cin1$ es en cis; por otra parte es incapaz de suplir en trans la función 0 para el plaqueo del fago $imm21029$ que carece -

TABLA I-2. Fenotipo de mutantes bem⁻ : Las mutantes bem⁻ junto con los fagos enlistados en la tabla se plaquearon en diferentes cepas bacterianas indicadoras para probar su genotipo. Se probaron en la cepa N2668 (en donde un fago red⁻ no forma placas), en la cepa M72(λ) donde no forman placas fagos con la inmunidad del profago, en la cepa M72(imm434); en la cepa Q1 donde los fagos son turbios a 32°C sí son capaces de establecer represión y a 42°C donde los fagos cIts (857) son claros. En las cepas mencionadas anteriormente se obtuvieron los resultados esperados. También se probaron en las cepas himA⁻ (K5185 y K936) y hip⁻ donde los fagos cin⁻ no forman placas. La letra (t) significa formación de placas turbias; la letra (c) significa formación de placas claras; la letra (lt) ligeramente turbias y el signo (-) implica que este fago no forma placas (aún a concentraciones de 10^7). En la tabla sólo se muestran aquellos resultados que podrían ser relevantes.

TABLA I-2

FENOTIPO DE MUTANTES bem⁻

FAGO	Q1		himA ⁻ (ó hip ⁻)	
	32°	42°	32°	42°
<u>λ</u> ⁺	t	t	c	c
<u>cI857cII</u> ⁺	t	c	c	c
<u>cI857cII68</u>	c	c	c	c
<u>cI857cin1cII</u> ⁺	t	c	-	c
<u>cI857cin1cII68</u>	t	c	-	c
<u>sib3cI857cin1cII68</u>	t	c	-	c
<u>cI857cin1cnclcII68</u>	c	c	c	c
<u>cI857cin1bem</u> ⁻ <u>cII68</u>	t	c	t	c
<u>inth3</u>	t	c	t	c

de ella, sugiriendo que posiblemente no expresa las funciones de replicación (el crecimiento que se observa a 42°C posiblemente se deba al fago cI857cin1cII68, ya que a esta temperatura no parece haber inhibición en himA⁻). El fago imm434cin1cII68 tampoco inhibe el crecimiento del fago cI857cII68 y tampoco complementa con el fago imm21029 a ninguna de las 2 temperaturas. El hecho de que el efecto inhibitor en himA⁻ se observe a las 2 temperaturas para imm434cin1 podría sugerir algún papel para el represor ya que el fago cI857cin1 sólo muestra el efecto a baja temperatura donde el represor es funcional.

b) ENSAYO DE PLACA ROJA EN UNA CEPA himA⁻ DE bem⁻:

Miller et al (1980) aislaron la mutante del fago lambda inth cuya integrasa tiene una actividad más eficiente de la normal y que además es activa en condiciones himA⁻ (se aisló por formación de placa roja en himA⁻). Los fagos inth muestran un fenotipo similar a los de bem⁻ en himA⁻ (ver tabla I-2, línea 10).

Para establecer si existía una correlación de fenotipos entre inth y bem⁻ se efectuó el ensayo de placa roja en una cepa himA⁻. Se encontró que las mutantes bem⁻, si bien son turbias son incapaces de generar un fenotipo rojo como inth (tabla I-4), sugiriendo que bem⁻ es un tipo de mutación diferente.

c) EFICIENCIA DE MUTANTES bem⁻ PARA PROMOVER RECOMBINACION INTEGRATIVA:

El fenotipo similar entre bem⁻ y sib⁻ (en placa roja) sugeriría un nivel de expresión mayor de int. Con el propósito de probar y cuantificar esta expresión en bem⁻ se realizó el ensayo de superinfección (Guarneros y Galindo, 1979; ver Material y Métodos y fig. II-1, PARTE II).

De los resultados (tabla I-5) se observa que el índice de integración obtenido para las mutantes bem⁻ (líneas 2 a 7) es muy similar a los índices de integración de bem⁺ y sib⁺ (líneas 1 y 8)

TABLA I-3. Complementación de bem^- : Estas pruebas de complementación se efectuaron por el método de estria como se describe - en la sección de material y métodos.

La columna de la izquierda (en la cepa S165) representa - complementación para represor con el fago cI^+cII68 que por ser cII^- es claro (c), pero cuando se coinfecta con un fago cI^-cII^+ ocurre complementación y aparece una región turbia en la intersección (t). Los resultados relevantes se dan a 42°C donde los fagos $cI857cin1$ que producen represor a 32°C no lo producen a 42°C; también se muestran los resultados a 32°C como control. En la tabla I-2 se pueden observar los fenotipos a ambas temperaturas de los fagos por separado. En la columna derecha se da la complementación en la cepa $himA^-$ (K5185 y K936) para ver los efectos en cis ó trans de las diferentes mutaciones fágicas. (+) denota formación de placas y (-) ausencia de las mismas.

TABLA I-3

COMPLEMENTACION DE bem^-

	S165		$himA^-$			
	$cI^+ cII68$		$cI857 cII68$		imm21029	
	32	42	32	42	32	42
<u>cI857</u>	t	t				
<u>cI857 cII68</u>	c	c				
<u>cI857 cin1</u>	t	t				
<u>cI857 cin1 cII68</u>	t	c	+	+	-	-
<u>cI857 cin1 cII68 bem^-</u>	t	c	+	+	+	+
<u>imm434 cin1 cII68</u>			+	+	-	-

TABLA I-4

ENSAYO DE PLACA ROJA EN UNA CEPA himA⁻ con bem⁻

FAGO	<u>himA</u> ⁻	K713
<u>sib</u> ⁺	-	-
<u>sib3</u>	-	-
<u>bem</u> ⁻	t	t
<u>inth3</u>	t	R

El ensayo de placa roja se efectuó como se describe en material y métodos. Se utilizó la cepa K713 que es una cepa de placa roja con una mutación himA⁻, como control de plaqueo se muestra el fenotipo de los fagos en himA⁻ (columna izquierda). La incubación se efectuó por 24 hrs a 34°C. Las letras y signos denotan el fenotipo de las placas: (-) es no crecimiento; (t) placas turbias y blancas; (R) placas rojas. Los fagos sib⁺ sib3 y bem⁻ también llevan las mutaciones ó marcadores HindIII red114cI857cin1. Las mutaciones bem⁻ utilizadas fueron bem1, 4 y 10.

TABLA I-5

EFICIENCIA DE LAS MUTANTES bem^- PARA
 PROMOVER RECOMBINACION INTEGRATIVA

AUXILIAR	INDICE DE INTEGRACION $\times 10^5$
bem^+	0.1
$bem1$	5.7
$bem2$	12.0
$bem3$	6.2
$bem4$	7.2
$bem5$	3.6
$bem6$	1.7
$cII68$	4.0
$sib3cII68$	1740.0

Se infectó la cepa SA731 $recA^-$ (int2red114imm434cII41gal8) a una mdi de 10 de cada fago. Todos los fagos utilizados llevan la mutación cI857. Todos los fagos bem en adición llevan los marcadores HindIIIred114cinlcII68. Los números en la tabla representan el índice de integración que significa los profagos escindidos por recombinación integrativa (fagos transductores de gal) por centro infectivo.

y están muy por debajo del índice de integración de sib⁻ (línea 9). Estos resultados indican que los niveles de expresión de int de bem⁻ no están alterados y sugieren que en el fenotipo Sib⁻ de estas, no están involucrados los niveles de integrasa. Probablemente exista una relación de este fenotipo y el observado en himA⁻. Por otro lado estos resultados confirman que los fagos bem⁻ son cII⁻.

d) FRECUENCIA DE LISOGENIA DE bem⁻:

Las mutaciones bem⁻ sobrepasan el efecto "letal" de la mutación cin1 en himA⁻ y además los fagos exhiben un fenotipo turbio (en himA⁻, hip⁻, Q1, ó S165). Para determinar si bem⁻ afectaba la eficiencia de lisogenia; se estimó la frecuencia de lisogenia (tabla I-6).

Los resultados muestran que las mutantes bem⁻ son aproximadamente un tercio ó un medio (columna 1, líneas 4, 5 y 6) de eficientes en lisogenización que bem⁺ (columna 1, línea 3). Estos resultados podrían indicar un nivel ligeramente menor de represor.

Dado que una cepa himA⁻ es deficiente en el establecimiento de la lisogenia (λ forma placas claras, Miller y Friedman, 1980 y tabla I-2) y en permitir el desarrollo de fagos cin⁻ (Williams et al, 1977 y tabla I-2) sólo se determinó el índice de viabilidad celular (cuenta viable de células sobrevivientes a la infección de fagos corregida por centros infectivos) permitidos por bem⁻cin⁻ y bem⁺cin⁻.

Cuando se infecta con bem⁺cin⁻ se obtiene un índice de viabilidad celular alto (línea 3) debido probablemente a que es improductiva la infección permitiendo el crecimiento bacteriano. Para la infección con cII68 se obtiene un índice de viabilidad 1600 menor que cin⁻, probablemente como resultado de un alto grado de lisis celular. Las infecciones con bem⁻cin⁻ dieron como resultado una reducción de únicamente de un factor de 32 para bem1 (línea 4) y de un factor de 12 para bem4 y 6 (líneas 5 y 6) con respecto a bem⁺cin⁻, tal vez debido a que estos fagos sintetizan represor (forman placas turbias en himA⁻, ver tabla I-2). No es

TABLA I-6

FRECUENCIA DE LISOGENIA DE MUTANTES bem^-

FAGO	S165	$himA^-$
	FRECUENCIA DE LISOGENIA	INDICE DE VIABILIDAD CELULAR
cII^+	1.7	5.0
$cII68$	7.3×10^{-3}	7.5×10^{-3}
$cin1cII68$	1.0	12.1
$bem1$	0.7	0.37
$bem4$	0.4	1.3
$bem6$	0.4	1.0

Los valores de la primera columna representan la frecuencia de lisogenia normalizados con centros infectivos. El ensayo se realizó en la cepa S165 a una mdi de 10 de cada fago. Los valores de la segunda columna es el índice de viabilidad celular en $himA^-$ que representa la cuenta viable de células sobrevivientes a la infección de los fagos (mdi de 10) corregida con los centros infectivos. El tiempo de incubación en ambas cepas fué de 90 min. a 32°C. Todos los fagos llevan la mutación $cI857$ y en adición los fagos bem^- , llevan la mutación $cin1$ como marcador relevante.

claro por que la infección con cII^+ da un índice de viabilidad tan alto (sólo 2.4 veces menor que cin^-) ya que forma placas - claras en $himA^-$.

e) TASA DE ECLOSION DE MUTANTES bem^- :

La mutación $cinI$ se localiza en la región 'Y' del operón PR (Wulff, 1976) y además de crear un promotor, incrementa la terminación en $tR1$ (Rosenberg *et al*, 1978). Las funciones de replicación se transcriben a partir de pR , pero $tR1$ se encuentra previo a estos genes (ver fig. A-2). Con el fin de examinar si existían diferencias en la producción de progenie cin^- y $bem^- cin^-$ se realizó un ensayo de tasa de eclosión tanto en una cepa $himA^+$ como $himA^-$ donde el efecto de cin^- resulta más aparente (tabla I-7).

Cuando el ensayo se efectúa en una cepa silvestre, no se encuentran diferencias aparentes para ningún caso (columna 1). Resultados similares se obtienen cuando se utiliza $himA^-$.

La explicación de que en la cepa $himA^-$ se obtenga progenie para fagos cin^- puede estar en la temperatura de incubación utilizada. Cuando el fago lleva la mutación $cI857$ (ts) el efecto letal de $himA^-$ sobre cin^- sólo se observa a $32^\circ C$ pero no a $42^\circ C$ (tabla I-2) donde el fago si forma placas que son aparentemente normales. El ensayo de tasa de eclosión se realizó a $39^\circ C$ donde el represor no es funcional.

MAPEO INICIAL DE MUTACIONES bem^- ;

Para la localización genética de las mutantes bem^- , en primer lugar se determinó si estas se encontraban a la izquierda ó a la derecha del sitio att . Para llevar acabo esto se realizaron las cruzas mostradas en la fig. I-2.

Sólo los recombinantes que llevan el brazo derecho de las mutantes bem^- (B, en la fig.) exhiben tanto el fenotipo de placa roja como el de plaqueo en $himA^-$ de los progenitores bem^- , indicando que las mutaciones se localizan a la derecha de att .

TABLA I-7

TASA DE ECLOSION DE MUTANTES bem^-

FAGO	TASA DE ECLOSION	
	S165	$himA^-$
cII68	1.4	-
cinlcII68	4.6	5.5
<u>bem1</u>	1.8	2.3
bem4	1.4	2.6
bem10	3.0	4.0

El ensayo se realizó por infección de las cepas S165 y him
 A^- a una mdi de 10 de cada fago. La temperatura de incubación -
 fué de 39°C por 30 minutos. Los números en la tabla representan
 la tasa de eclosión dividida entre centros infectivos que se -
 calcularon en la cepa Q1 (para más detalle ver la sección de -
 material y métodos). Todos los fagos llevan la mutación cI857.

LAS MUTACIONES bem^- SE LOCALIZAN A LA DERECHA DE att

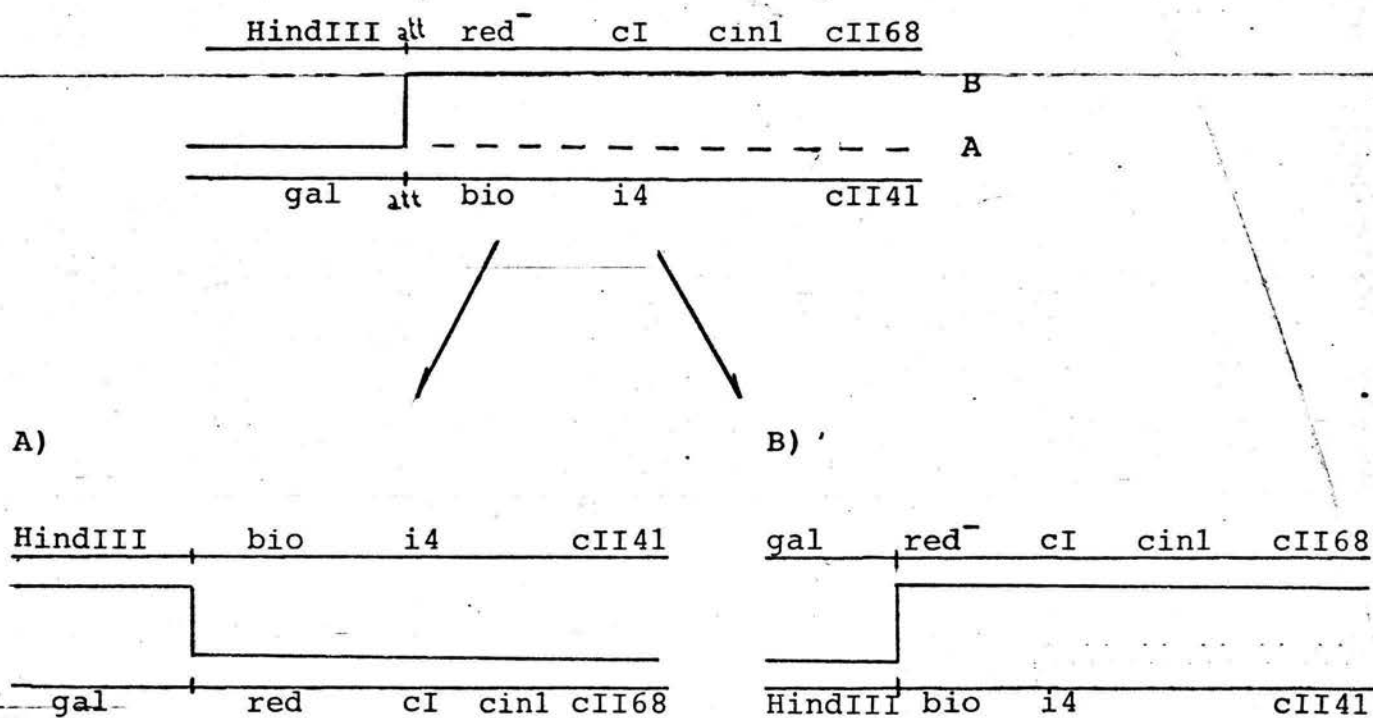


FIG. I-2. Para conocer de que lado con respecto a att se encontraban las mutaciones bem^- se realizaron las cruzas esquematizadas en la figura que se efectuaron como se describe en material y métodos. Se rescataron en forma independiente los brazos derecho e izquierdo de los 21 candidatos mutantes, que dan origen a los recombinantes gal8red114cI857cin1cII68 (B) y HindIIIbio11lim434cII41 (A). Con estos recombinantes se generaron fagos homólogos a los originales; los que después de purificados y propagados se probaron en el ensayo de placa roja y plaqueo en $himA^-$.

Se probaron 3 mutantes bem⁻ (1, 4 y 10) y estas se localizaron a la derecha de int y xis (a la derecha de bio11; recombinantes A, en la fig. I-3) ya que cuando adquieren la sustitución bio11 conservan el fenotipo turbio en himA⁻ (el fago bio11bem⁺cin⁻ no plaquea).

~~Cuando se mapeó con respecto a la región de inmunidad (mutantes bem1, 4 y 10) se encontró que las recombinantes λ imm434 turbias generadas (recombinación B, fig. I-3) sólo una parte de ellas plaqueaba en himA⁻ (fenotipo ligeramente turbio). Esto indicaría que las mutaciones se localizan a la derecha de λ imm434 y cuantificación de la frecuencia de esta recombinación podría dar la localización definida de las mutaciones; sin embargo de la recombinación con el fago bem⁺cin⁻ se obtuvieron resultados similares.~~

Cuando en vez de utilizar para la recombinación al fago λ imm434029 (B, fig. I-3) se utiliza el fago λ imm434cII68 (C, fig. I-3) (recombinación sólo de bem1), al probar las recombinantes imm434 turbias que se generaron, éstas no plaquean en himA⁻ (igual que bem⁺cin⁻) indicando que sólo se rescata la mutación cin1 pero no bem1. Estos resultados sugieren que la mutación se encuentra dentro de la región de inmunidad cI.

Por otra parte, cuando se recombinan bem⁺cin⁻ y bem⁻cin⁻ (bem1, 4 y 10) con imm21029 (D, fig. I-3) para preguntar si la mutación se encontraba a la derecha de la región de imm21 e izquierda de 029, no se encontraron diferencias entre los recombinantes imm210⁺ de bem⁺ y bem⁻ (todos los recombinantes crecen ligeramente turbios en himA⁻). Probablemente la explicación de los fenotipos turbios en himA⁻ de los recombinantes imm434 (recombinación B, fig. I-3) se deba a que el efecto de himA⁻ (defecto en el establecimiento de la lisogenia) no se observa con estos fagos (Miller 1980).

Una cuestión que faltó aclarar es si existen diferentes mutaciones bem⁻ que se contestaría recombinando entre sí y examinar la frecuencia con que se genera bem⁺.

FIG. I-3. MAPEO INICIAL DE MUTACIONES bem^- : Para saber si las mutaciones se encontraban a la derecha de los genes int y xis se obtuvieron los recombinantes gal8bio11cI857cin1cII68 por la recombinación mostrada en A) de bem^+ , $bem1$, 4 y 10. Los recombinantes se seleccionaron en la cepa S165(P2) donde sólo crecen los fagos bio y se seleccionaron los que llevaran inmunidad cI. Para saber si las mutaciones se localizaban a la derecha de la región de inmunidad imm434 inicialmente se efectuaron cruzas como las descritas en B), donde se seleccionaron las recombinantes imm434 turbias por crecimiento en la cepa M72 (λ) ó se tomaron inicialmente de la cepa S165 y después de probar inmunidad (picando) se seleccionaron las placas imm434. Para el fago bem^+ se obtuvo una frecuencia de recombinación de 7.8×10^{-3} , para $bem1$ de 2×10^{-3} , para $bem2$ de 3.7×10^{-3} , $bem3$ 1×10^{-3} , $bem4$ 3.6×10^{-3} , $bem5$ 6.4×10^{-3} y $bem6$ de 9×10^{-3} de recombinantes turbias imm434. Estas se probaron por plaqueo en $himA^-$.

Cuando las cruzas se realizaron como se muestra en C), los recombinantes imm434 turbios se seleccionaron en la cepa S165 a 42°C (sólo se efectuó para $bem1$). Posteriormente de probar sus marcadores, se examinó sobre $himA^-$. Cuando se quizó preguntar en relación a la región de inmunidad imm21 se efectuó la cruzada mostrada en D), donde los recombinantes se seleccionaron en la cepa S601() $recA^-$, donde sólo crecen los recombinantes imm210⁺; los cuáles se probaron en $himA^-$. Se obtuvo una frecuencia de recombinación de 2.4×10^{-4} para bem^+ ; de 2.71×10^{-4} para $bem1$; de 1.2×10^{-4} para $bem4$ y de 2×10^{-4} para $bem10$. En general se probaron de 10 a 100 placas de cada recombinante.

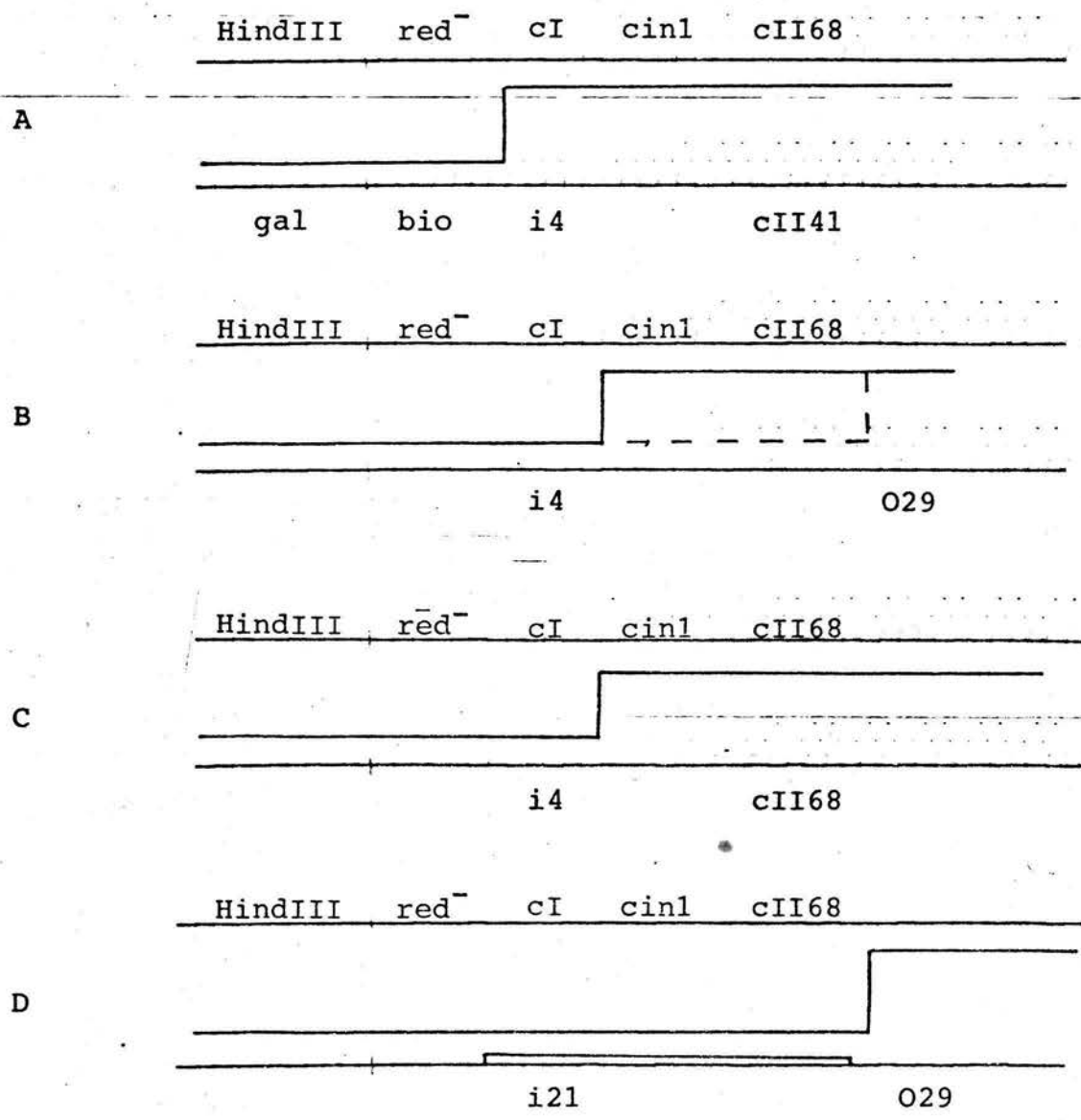


FIG. 1-3. MAPEO INICIAL DE MUTACIONES bem⁻.

DISCUSION

Algunos ensayos permiten la diferenciación entre fagos sib⁺ y sib⁻, tales como cruza lítica, att², superinfección y tapíz mixto (Guarneros et al, 1982; Galindo, J.M., com. per.; parte II, este trabajo); sin embargo el desarrollo de estos resulta un poco laborioso y pueden ser usados más como pruebas de caracterización que de selección de mutantes.

El ensayo de placa roja, es muy sencillo y como fué establecido en el presente trabajo puede servir para obtener diferencias cualitativas entre fagos sib⁺ y sib⁻, por lo cuál resultó atractivo como método de selección de mutantes con fenotipo Sib⁻. Con este fenotipo puede en principio obtenerse alteraciones en alguna secuencia ó gene que regule directa o indirectamente al gene int, como una reversión de cII⁻ a cII⁺; una alteración en el extremo 3' del gene int, que impidiera la retroinhibición (este tipo es especulativo); una mutación que incrementará la actividad de la proteína para recombinar (como inth); mutaciones en sib, que resultarían interesantes si fueran diferentes a las 3 existentes.

Las mutantes bem⁻ aisladas por placa roja si bien exhiben un fenotipo Sib⁻, mapean y tienen características diferentes a las mencionadas arriba. Un punto importante aunque oscuro para este resultado, probablemente este en el modo de selección; ya que se eligieron placas rojas iguales que las de sib₃ que fueron más intensas que las de sib₁ y sib₂; hecho al que no se ha encontrado una explicación satisfactoria, ya que en otros ensayos no se observan diferencias entre las sib (ver resultados).

Una de las características que parece relevante de las mutaciones bem⁻ es que sobrepasan el efecto letal de la mutación cin⁻ en bacterias himA⁻ (ó de hip⁻ y nusA⁻). Los fagos cin⁻ no

forman placas en una cepa himA⁻ por razones que se desconocen - (Williams et al, 1977) pero que podrían implicar una interacción diferente de las establecidas para HimA con el bacteriófago lambda. La mutación cin1 además de crear un promotor para cI independiente de CII, también incrementa la terminación en tR1 (Rosenberg et al, 1978; Rosenberg y Court, 1979; Wulff et al, 1980). Si uno de estos efectos ó la unión de ambos son los responsables del efecto en himA⁻ se desconoce; pero uno podría especular acerca de que un incremento en la terminación en tR1 tendría consecuencias severas para el fago como reducir los niveles de expresión de cII y las funciones de replicación O y P. Un sitio de unión cercano ó sobre tR1 se ha sugerido para HimA y Hip' (Craig y Nash, com. - per. a Wulff) y una de las funciones de HimA en esa región podría ser la de actuar como antiterminador (directa ó indirectamente) en tR1. Otra explicación para la ausencia de plaqueo, es que los fagos cin⁻ sobreproducen represor en himA⁻; sin embargo la mutación cin⁻ parece actuar en cis más que en trans en esta cepa (ver tabla 3, parte B) aunque no se descarta algún papel del represor ya que el efecto letal se observa a 32°C pero no a 42°C con fagos cI857cin1 (tabla 2). A alta temperatura el represor no es funcional; el efecto se observa en ambas temperaturas con fagos cin⁻ que no tienen un represor termosensible.

Por estudios iniciales de mapeo, las mutaciones bem⁻ se localizaron en la región de inmunidad cI (bem1) (tipo I) aunque otras podrían encontrarse a la derecha de imm434, presumiblemente cerca de cin1 (tipo II).

Las mutaciones bem⁻ tipo I podrían localizarse en el gene cro (la función CI no parece alterarse y cro es el otro gene de esta región y parece buen candidato). Si este fuera el caso, la transcripción de pL podría incrementarse y elevar los niveles de Int y Xis, sin embargo los niveles de Int no parecen alterarse - (tabla 5). Otra alternativa sería que debido a que cro⁻ estimula

la lisogenización de fagos c_{III}^- ó c_{II}^- (Jones y Herskowitz, 1978) un nivel de represión mayor podría favorecer un fenotipo de placa roja parecido a sib^- en contraste al caso cro^+ ; sin embargo las mutantes bem^- parecen tener ligeramente reducido más que incrementado el nivel de represión (tabla 6). La explicación para este resultado podría ser que el efecto de cro^- se ha observado a multiplicidades de infección bajas (0.1-0.5, Jones y Herskowitz, 1978) mientras que la multiplicidad utilizada en este trabajo fué de 10 que podría saturar el sistema.

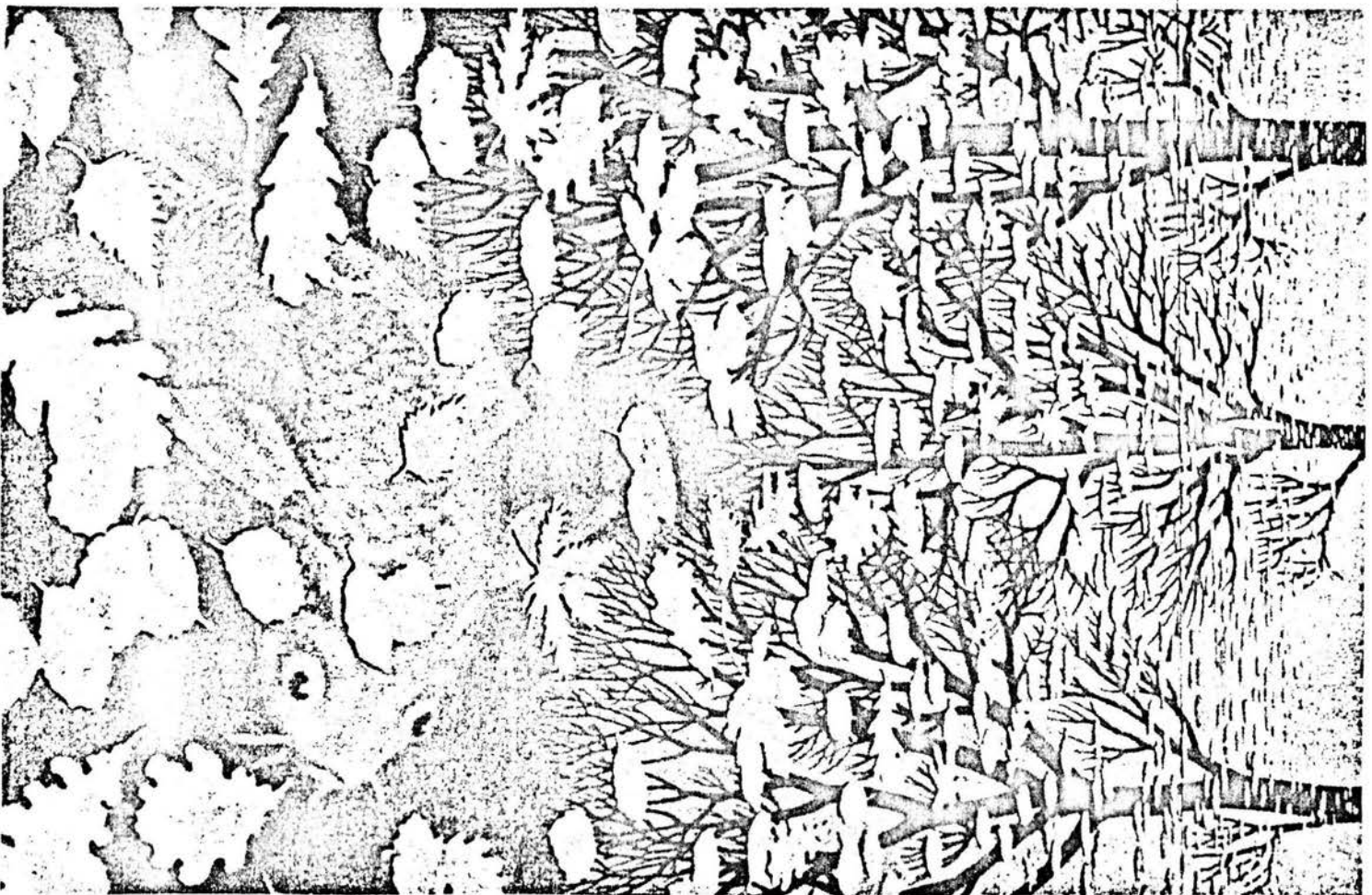
No es claro como una mutación cro^- sobrepasaría el efecto de cin^- , sin embargo un fago cro^- que no plaquea en $himA^+$ puede plaquear en $himA^-$ (por ausencia de síntesis de represor).

Las mutantes bem^- tipo I no se comportan como típicas mutantes cro^- , las cuáles no crecen a 42°C. Las evidencias presentadas aquí no parecen soportar el hecho de que bem^- tipo I sea cro^- , sin embargo esta mutación puede ser un ejemplo de las diferencias entre cro^- como las encontradas por Takeda *et al* (1975) que por ejemplo difieren en su capacidad de apagar la transcripción de pL y pR. Sería interesante construir fagos cro^-cin^- y examinar sus fenotipos.

Las mutaciones bem^- tipo II podrían encontrarse cercanas a $cin1$ muy posiblemente en la secuencia de reconocimiento de HimA; estas mutaciones podrían no alterar la función del promotor de cin^- pero sí alterar la eficiencia de terminación en $tR1$ y así sobrepasar el requerimiento de HimA como antiterminador. Estas mutantes presumiblemente tendrían los niveles de las funciones a la derecha de $tR1$ incrementados con respecto a cin^- y dar las diferencias en placa roja (por ej. una mayor replicación).

Existe una mutación que revierte los efectos de $cin1$ (McDermid *et al*, 1976). Esta mutación llamada cnc afecta tanto la función de promotor como la de terminador y además el efecto observado en la bacteria $himA^-$ (tabla I-2). Las mutaciones bem no parecen afectar la función del promotor y en un caso al menos tampoco la función del terminador, pero sí el efecto en -

himA⁻, por lo que las hace novedosas. Las mutaciones ben⁻ sólo -
son aparentes con cin⁻, y un estudio más profundo de estas podrí
a ayudar a entender el papel de HimA (en conjunto con Hip) en -
esa región ('y') que es clave para la regulación del ciclo vital
del bacteriófago lambda.



Tres mundos, de M. C. Escher.

PARTE II

"COMPLEMENTACION INTRAGENICA DE CII"

...me parece a mí que solo he sido como un niño jugando en una playa, que se divierte al encontrar de vez en cuando una guija más lisa o una concha más bonita que de costumbre, en tanto que el enorme océano de la verdad yace ante él sin ser descubierto.

Isaac Newton.

RESULTADOS

AUSENCIA DEL EFECTO DE sib:

En la parte I de resultados se estableció una diferencia --
cualitativa entre fagos sib⁺ y sib⁻ (HindIIIred114cI857cinlcII68)
en el ensayo de placa roja (tabla I-1). Con el fin de obtener -
una medida de esa diferencia, se procedió a medir la recombi-
ción integrativa por el ensayo de cruza lítica; recombinación de
un fago normal (sitio PP') y un fago transductor de gal y bio -
(sitio BB'). Sorpresivamente por este ensayo no se obtuvieron di-
ferencias significativas entre sib⁺ y sib⁻. Resultados similares
se encontraron al realizar el experimento en varias cepas bacte-
rianas, en diferentes condiciones de adsorción (temperatura ambi-
ente y en frío) y al variar la dilución de la mezcla de infección
(1:10 y 1:100) (datos no mostrados).

El objetivo de esta parte es el de esclarecer la naturaleza
del enmascaramiento de la inhibición por sib encontrado en estas
cruzas.

LA AUSENCIA DEL EFECTO INHIBIDOR DE sib SE DEBE A UN MARCADOR GENETICO DEL FAGO:

Al probar otros fagos sib⁺ y sib⁻ (red114imm434cII41) se
observó una diferencia en el porcentaje de recombinación integra-
tiva en favor del fago sib⁻ (línea 1, tabla II-1), mientras que
entre los fagos sib⁺ y sib⁻ (HindIIIred114cI857cinlcII68) no se
encontraron diferencias significativas (línea 2, tabla II-1).

Estos resultados indican que algún marcador (ó marcadores)
genético (s) del fago HindIIIred114cI857cinlcII68 es el responsa-
ble de la ausencia del efecto de sib. Por otra parte, de los re-
sultados de la tabla II-1 se observa que los valores de recombina

TABLA II-1

AUSENCIA DEL EFECTO DE sib EN RECOMBINACION INTEGRATIVA
 POR CRUZAS LITICAS (PP' x BB')

FAGO PP'	% DE RECOMBINACION CON BB'cII41	
	sib ⁺	sib ⁻
cII41	2.6	19.0
HindIIIcinIcII68	23.0	17.0

Se infectó la cepa S601 \underline{recA}^- \underline{gal}^- con los siguientes fagos PP': $\underline{red114imm434cII41}$; $\underline{sib3red114imm434cII41}$; HindIII $\underline{red114cI857cinIcII68}$ y HindIII $\underline{sib3red114cI857cinIcII68}$. El fago BB' utilizado fué $\underline{gal8biollimm434cII41}$. Se usó una mdi de 10 de cada fago. Las células infectadas fueron diluidas 1:100. Los números en la tabla representan el porcentaje de recombinación sitio-especifica que se estimó por plaqueo en la cepa 198 \underline{recA}^- \underline{gal}^- \underline{supF} , donde solamente plaquean el progenitor PP' (placas blancas) y el recombinante BP' (placas rojas). Los datos de la primera línea son el promedio de 2 experimentos y los de la segunda línea de 3. Las cruzas muestran una variabilidad de aproximadamente el 20%. Para más detalle ver Material y Métodos.

ción integrativa obtenidos con los fagos sib⁺ y sib⁻ (HindIIIred 114cI857cinlcII68) son muy similares a los observados para el fago sib⁻ (red114imm434cII41). Estos resultados indican una situación fenotípicamente sib⁻.

Para conocer que mutación (ó mutaciones) anulaba el efecto de sib se examinaron fagos con diferentes marcadores como Hind-III, cin1 y cII68. También se decidió probar el efecto de las mutaciones cinlcII68 en una posición en trans con respecto a sib e int, lo cuál se logra colocandolas en el fago BB'.

De los resultados de la tabla II-2 se observa que en las cruzas de los fagos sib⁺cII41 y sib⁻cII41 con el fago BB'cinlcII68 (líneas 1 y 4, columna 2) se elimina el efecto de sib, que se observa cuando se recombinan con el fago BB'cII41 (línea 1 y 4, columna 1).

De la columna 1 (cruzas con el fago BB'cII41) se observa que los fagos con la mutación cII68 producen un porcentaje de recombinación semejante al producido por el caso sib⁻ (comparar líneas 5, 6, 7 y 8 con la línea 4). En otras cruzas efectuadas de los fagos cII68, cinlcII68 y cinlcncIcII68 con BB'cII41 no se encontraron diferencias de recombinación entre ellos (datos no mostrados. cncl revierte el efecto de cin1 McDermitt, 1976).

Estos resultados sugieren que la mutación cII68 es la responsable de la ausencia de las diferencias entre sib⁺ y sib⁻ (independiente de la posición cis ó trans).

Una explicación para la ausencia de la inhibición por sib podría ser que la proteína mutante CII68 activara pI. Sin embargo esta hipótesis no explica satisfactoriamente el resultado de placa roja y no es consistente con los resultados de otros autores (Chung y Echols, 1977). Una hipótesis alternativa que podría explicar los resultados supone que existe una complementación entre CII41 y CII68 que generaría un producto que activa la expresión de int a partir de pI (en todos los casos donde se encuentra la combinación cII41 y cII68 se elimina el efecto de sib).

TABLA II-2

EFICIENCIA DE DIFERENTES MUTACIONES PARA ELIMINAR EL EFECTO sib

FAGO PP'	% DE RECOMBINACION INTEGRATIVA FAGO BB'	
	cII41	cinlcII68
cII41	5.0	29.0
cinlcII41	2.4	ND
HindIIIcII41	2.5	ND
sib3cII41	28.0	42.0
cII68	30.0	ND
cinlcII68	32.0	ND
HindIIIcinlcII68	28.0	ND
HindIIIsib3cinlcII68	27.0	ND

Las cruas se llevaron acabo en la cepa S601 recA^- gal^- a una mdi de 10 de cada fago. Los fagos PP' que se utilizaron (en el orden arriba indicado) son: red114imm434cII41 ; cI857cinlcII41 ; HindIIIcI857cII41 ; $\text{sib3red114imm434cII41}$; cI857cII68 ; cI857cinlcII68 ; $\text{HindIIIred114cI857cinlcII68}$ y $\text{HindIIIsib3red114cI857cinlcII68}$. Los fagos BB' fueron $\text{gal8biollimm434cII41}$ y $\text{gal8biollcI857cinlcII68}$. En la tabla se dan los porcentajes de recombinación integrativa que se calcularon en la cepa 198 recA^- gal^- supF . Los valores de la primera columna representan el promedio de 2 experimentos, los de la columna 2 solamente uno. ND significa no determinado.

EFFECTO DE sib EN EL ENSAYO DE SUPERINFECCION

FAGO AUXILIAR	INDICE DE INTEGRACION x 10 ⁵
cII68	0.3
cinlcII68	0.8
cinlcII41	0.8
cII41	0.8
sib3cII41	1500.0

Se infectó la cepa SA731recA⁻ (int2red114imm434cII41gal8) a una mdi de 10 de cada fago. Todos los fagos enlistados arriba - son cI857. Los valores representan los profagos escindidos por recombinación integrativa (fagos transductores de gal) por centro infectivo que se define como índice de integración. Para más detalle ver la sección de Material y Métodos.

COMPLEMENTACION INTRAGENICA ENTRE CII41 y CII68:

Si la ausencia del efecto de sib se debe a la complementación CII41/CII68 al analizar los fagos por separado no se afectaría la inhibición de int por sib. Para tal efecto se utilizó el ~~ensayo de superinfección (sólo se requiere de la participación~~ de un fago auxiliar que proporcione Int para la escisión de un profago flanqueado por los sitios PP' y BB' (Guarneros y Galindo, 1979).

Los resultados obtenidos en el ensayo de superinfección se muestran en la tabla II-3. Se observa que los fagos cII68 (y cinlcII68; líneas 1 y 2) son igualmente eficientes en promover recombinación integrativa que los fagos cII41 (y cinlcII41; líneas 3 y 4). La eficiencia de recombinación integrativa del fago sib⁻cII41 (línea 5) es cerca de 2000 veces mayor que la de todos los casos anteriores. De estos resultados se puede concluir que la mutación cII68 es incapaz de provocar la ausencia del efecto de sib por sí sola.

Para probar la hipótesis de la complementación se realizaron las cruzas descritas en la tabla II-4.

Cuando las cruzas se efectúan entre cII41 y cII68 (línea 1, columna 2 y línea 2, columna 1) los porcentajes de recombinación se incrementan con respecto a los obtenidos para las cruzas de cII41 ó cII68 entre sí (línea 1, columna 1 y línea 2, columna 2).

Por otra parte se observa que el porcentaje de recombinación integrativa obtenido para las cruzas de cII68 entre sí, posiblemente debido a una actividad leaky de CII68.

Resultados similares a cII⁺ se encontraron para los casos sib3cII41 y sib3cII68 (datos no mostrados). De estos resultados se puede concluir que existe una complementación intragénica en-

TABLA II-4

COMPLEMENTACION DE cII41 y cII68 PARA PROMOVER RECOMBINACION INTEGRATIVA EN CRUZAS LITICAS

8 DE RECOMBINACION INTEGRATIVA		
FAGO BB'		
FAGO PP'	<u>cII41</u>	<u>cII68</u>
<u>cII41</u>	0.3	12.0
<u>cII68</u>	14.0	4.0
<u>cII</u> ⁺	17.0	30.0

La recombinación se efectuó en la cepa S601recA⁻gal⁻ a una mdi de 10 de cada fago. Los fagos PP' fueron cI857cII41; cI857-cII68 y cI857. Los fagos BB' utilizados fueron gal8bio11imm434-cII41 y gal8bio11cI857cII68. Los porcentajes de recombinación - que se dan en la tabla fueron calculados del plaqueo en la cepa 198recA⁻gal⁻supF y son el promedio de 2 experimentos excepto para los casos cII⁺ que es de uno (valores similares a cII⁺ se encontraron para los casos sib3cII41 y sib3cII68 en 2 experimentos).

TABLA II-5

AUSENCIA DE COMPLEMENTACION cII41/cII68
 EN EL ENSAYO DE SUPERINFECCION

FAGO AUXILIAR	INDICE DE INTEGRACION x 10 ⁵
<u>cII41</u>	1.5
<u>cII68</u>	2.6
<u>cII41 + cII68</u>	1.1
<u>cII⁺</u>	3200.0

Se infectó la cepa Sa731recA⁻ (int2red114imm434cII41gal8) a una mdi de 10 de cada fago. Todos los fagos utilizados llevan la mutación cI857. Los números de la tabla denotan el índice de integración que representa los profagos escindidos por recombinación integrativa (fagos transductores de gal) por centro infectivo (valores semejantes a cII⁺ se obtuvieron para sib3cII41 y sib3cII68; datos no mostrados).

tre los alelos cII41 y cII68. El fragmento polipeptídico CII41 podría estabilizar la proteína CII68 e incrementar su actividad.

Una vez demostrada la complementación en cruzas líticas para recombinación integrativa, se trató de comprobar la complementación de cII41 y cII68 en el ensayo de superinfección.

Los resultados muestran que la coinfección (línea 3, tabla II-5) da valores similares en el índice de integración a las infecciones de las mutantes por separado (líneas 1 y 2). Estos resultados indican ausencia de complementación. Para el caso cII⁺ (línea 4) se obtuvo un índice de integración cerca de 1000 veces más que los casos cII⁻.

EFFECTO DE hfl SOBRE LA COMPLEMENTACION DE CII41/CII68:

La ausencia de complementación en superinfección podría deberse a la expresión conjunta de pL y de pI. Con la finalidad de estudiar sólo la expresión de int a partir de pI se deben introducir 2 cambios con respecto al experimento anterior (tabla II-5):

1) Utilizar fagos con la mutación nutL44, que impide la transcripción de int a partir de pL. 2) La superinfección se debe realizar en una cepa hfl⁻, debido a que los fagos nutL⁻ no expresan CIII, que es requerido para la función de CII (CIII antagoniza Hfl, ver introducción).

En la tabla II-6 se observa que en la cepa hfl⁻ (columna 1), la coinfección cII68/cII41 a una mdi de 10 es más eficiente en promover la actividad de Int que las infecciones sencillas de cII41 y cII68 (comparar línea 4 con línea 1 y 2). Estos resultados sugieren complementación entre CII41 y CII68, aunque el valor de recombinación para la coinfección es menor que el encontrado

TABLA II-6

EFFECTO DE *hfl* SOBRE LA COMPLEMENTACION *cII41/cII68* EN
 SUPERINFECCION CON FAGOS *nutL*⁻

ϕ AUXILIAR <i>nutL</i> ⁻	INDICE DE INTEGRACION × 10 ⁵	
	<i>hflA</i> ⁻	<i>hflA</i> ⁺
<i>cII41</i>	0.1	0.1
<i>cII68</i>	0.7	0.1
<i>cII41</i> + <i>cII68</i> *	3.0	0.1
<i>cII41</i> + <i>cII68</i>	20.0	0.1
<i>cII</i> ⁺	200.0	30.0
<i>nutL</i> ⁺ <i>cII</i> ⁺	2000.0	4000.0

Se infectaron las cepas SA731^{recA}⁻*hflA*⁺ (*int2red114imm434cII-41gal8*) y SA731^{recA}⁻*hflA*⁻ (*int2red114imm434cII41gal8*) a una mdi de 10 de cada fago, excepto para el caso (*) donde se utilizó una mdi de 5 para cada fago. Todos los fagos llevan la mutación *cI857*. La mutación *nutL44* se utilizó con los fagos de las primeras 5 líneas. Este experimento se realizó 2 veces con resultados similares.

Falta página

N° 55

EFFECTO DE hfl^- EN LA COMPLEMENTACION EN EL ENSAYO DE
SUPERINFECCION CON FAGOS $nutL^+$

FAGO AUXILIAR	INDICE DE INTEGRACION $\times 10^5$
cII41	5
cII68	16
cII41 + cII68 *	20
cII41 + cII68	30
cII ⁺	3000

Se infectó la cepa SA731 hfl^-lrecA^- (int2red114imm434cII41gal8) a una mdi de 10 de cada fago, excepto para (*) donde fué de 5 para cada fago. Todos los fagos auxiliares portan la mutación cI857. - Los números en la tabla representan los profagos escindidos por re combinación integrativa (fago rojo) normalizados con los centros infectivos y son el promedio de 2 experimentos. Para más detalle - ver Material y Métodos.

EFFECTO DE hfl SOBRE LA COMPLEMENTACION EN
EL ENSAYO DE CRUZA LÍTICA

CRUZA P x B	hfl ⁺	hfl ⁻
cII ⁺ x cII ⁺	45.0	41.0
cII41 x cII41	0.2	0.1
cII68 x cII68	4.0	3.0
cII41 x cII68	11.0	10.0
cII68 x cII41	18.0	23.0

La recombinación se realizó en las cepas S165 y S165hfl⁻. Se utilizó una mdi de 10 de cada uno de los fagos . Los fagos - att-P fueron: cI857, cI857cII41 y cI857cII68, y los fagos att-B: gal8biollcI857, gal8biollcI857cII68 y gal8biollimm434cII41. Los porcentajes de recombinación se calcularon por plaqueo en la cepa 198recA⁻gal⁻supF.

ambas condiciones. El valor de la complementación tiene la misma magnitud en ambas cepas, así como el efecto leaky de cII68.

AUSENCIA DE COMPLEMENTACION EN REPRESION:

La proteína CII regula coordinadamente la expresión de los promotores pI y pE para la transcripción de los genes int y cI respectivamente. Los resultados mostrados anteriormente sugieren que CII68 en conjunto con CII41 activan la expresión de pI. Con el fin de examinar si la activación también era válida para la activación de pE, se planteó el realizar un ensayo de frecuencia de lisogenia (aunque hay que hacer notar que esta es una medida muy indirecta para determinar activación de pE, sin embargo no se encontró otro ensayo más adecuado).

Belfort et al (1975) reportaron ausencia de complementación para la producción de represor entre cII41 y cII68 (entre otras mutantes de cII analizadas). Cuando se realizó una prueba de complementación cualitativa (por estría) ó cuando se estimó la frecuencia de lisogenia también se encontró ausencia de complementación entre cII41 y cII68 (datos no mostrados). Estos resultados confirman los obtenidos por Belfort y colaboradores.

Dado que la complementación en el ensayo de superinfección sólo es aparente en condiciones hfl⁻, se decidió medir la frecuencia de lisogenia en una cepa hfl⁻ con fagos nutL⁺ y nutL⁻. Los resultados se muestran en la tabla II-9.

Se puede observar que no existe un incremento en el valor obtenido para las coinfecciones (líneas 3 y 4) con respecto al valor obtenido con las infecciones sencillas (líneas 1 y 2), su

TABLA II-9

AUSENCIA DE COMPLEMENTACION cII41/cII68 EN REPRESION

FAGO	FRECUENCIA DE LISOGENIA	
	CENTRO INFECTIVO	
	<u>nutL⁻</u>	<u>nutL⁺</u>
cII41	0.02	1.0
cII68	0.40	4.0
cII41 + cII68 *	0.20	0.70
cII41 + cII68	0.50	0.10
cII ⁺	112.0	154.0

Se utilizó la cepa S165 hfl⁻. La mdi fué de 10 para cada uno de los fagos, excepto para (*) donde fué de 5. Todos los fagos - llevan la mutación cI857. Los valores representan la frecuencia - de lisogenización normalizados con los centros infectivos y multiplicados por 100.

giriendo que no existe complementación. Por otra parte se puede observar que la frecuencia de lisogenia obtenida para el caso - cII68 es mayor (de 4 a 20 veces) que la obtenida para cII41 (comparar líneas 1 y 2 de ambas columnas), probablemente debido a la actividad leaky de CII68. Por otra parte los valores con los fagos nutL⁺ son mayores que los de nutL⁻, posiblemente por que estos últimos no expresan CIII.

COMPLEMENTACION EN EL ENSAYO DE att²:

El efecto de CII sobre la activación de pI es dependiente de la multiplicidad de infección (mdi) que se utilice, mientras que el efecto de sib sobre la expresión de int es independiente de la mdi. En el experimento de la tabla II-10 se examinó el efecto de la mdi en la complementación entre cII41 y cII68 y se comparó con el efecto sib usando otro ensayo que también mide la recombinación integrativa llamado att² (Nash, H. A. [1974], Virology 57:287).

Cuando se analizan los resultados con el fago att²cII41 (columnas 1 y 2) se observa el efecto de sib a las 2 mdi de los fagos auxiliares cII41 (líneas 1 y 2). Algo similar se encuentra con estos mismos auxiliares cuando se ensayan con el fago att²cII68 (líneas 1 y 2, columnas 3 y 4). Por el contrario, cuando se utilizaron los auxiliares cII68 (a una mdi de 10) con el fago att²cII41 el efecto de sib desaparece (líneas 3 y 4, columna 1); pero este efecto sí se observa cuando se utiliza una mdi de 1 de los auxiliares (líneas 3 y 4, columna 2). Cuando los auxiliares como el fago att² son cII68 el efecto de sib se observa a una mdi de 1

COMPLEMENTACION DE cII41 y cII68 en att²

FAGO AUXILIAR	% DE Ø EDTA-RESISTENTE <u>imm</u> att ²				
	cII41		Ø att ²		cII68
	(10:1)	(1:1)	(10:1)	(1:1)	(1:1)
cII41	0.9	1.4	1.1	0.3	
sib ⁻ cII41	16.2	13.7	16.7	6.2	
cII68	18.0	1.9	6.0	0.4	
sib ⁻ cII68	14.0	28.0	10.0	4.8	

Los números en la tabla representan la actividad de Int medida como el porcentaje de fagos EDTA-resistentes imm att². El experimento se realizó a 2 mdi de los fagos auxiliares que se indican entre parentesis (de 10 y de 1). Los fagos sib⁻ llevan la mutación sib3.

pero no a una mdi de 10 (líneas 3 y 4, columnas 3 y 4).

Debido a que CII es activa a una multiplicidad de infección alta enmascara el efecto de sib sobre la expresión del gene int ya que este se expresa de pI. Esta sería una de las conclusiones de este experimento. El valor de la coinfección cII41/cII68 es 3 veces mayor que el obtenido para el caso cII68/cII68 (a mdi de 10; ver líneas 3, columnas 1 y 3) y muy similares a todos los casos sib⁻. Estos resultados podrían sugerir un efecto de complementación. Por otra parte también queda claro el efecto leaky de CII68 que puede ser clave para la complementación; también se puede apreciar que el factor de la multiplicidad de infección alta es más crucial para cII68 que para cII41.

DISCUSION

El gene int se transcribe a partir de dos promotores; del promotor proximal pI, cuando se activa por la proteína CII y del promotor distal pL, bajo la acción positiva de la proteína N. La expresión de int del transcrito de pL se inhibe por sib; sin embargo mutaciones sib⁻ eliminan ésta inhibición. El efecto de sib, sólo se observa en condiciones cII⁻. La infección de fagos cII⁻ produce niveles bajos de Int debido a sib, e infecciones con fagos sib⁻cII⁻ produce niveles comparables a los expresados con fagos cII⁺ (Guarneros et al, 1982).

En esta parte se investigó la ausencia del efecto inhibitor de sib observado en cruza líticas del tipo PP' x BB' con fagos cII68 y cII41 (tablas 1, 2 y 3, Parte II).

Los resultados presentados sugieren que este enmascaramiento se debe a una complementación intragénica entre cII68 y cII41 (tabla II-4).

El efecto de la complementación en el ensayo de superinfección es dependiente de condiciones hfl⁻ y el efecto no es tan pronunciado como en las cruza líticas. La clave para explicar éstas disparidades puede estar en la naturaleza de los ensayos. Si bien en ambos parece influir el mismo tipo de factores tales como dependencia de Int, CII, mdi y termolabilidad, el ensayo de superinfección es más sensible y las diferencias entre cII⁺ y cII⁻ se incrementan 10 veces ó más que en la cruza lítica por razones que no se explicaron satisfactoriamente (Guarneros y Echols,

1973; Chung y Echols, 1977; Guarneros y Galindo, 1979).

Una diferencia entre ambos ensayos, es la estructura molecular de los sustratos de recombinación. En las cruzas líticas la recombinación es una reacción intermolecular (entre los DNAs de los fagos PP' y BB'); mientras que en la superinfección la reacción es un evento intramolecular (escisión del profago flanqueado por los sitios PP' y BB') (fig. II-1).

En las cruzas líticas el fago PP' además de participar en la reacción de recombinación como sustrato, también expresa la integrasa para la reacción. Después de un evento de recombinación entre los progenitores PP' y BB' se generan recombinantes PB' y BP' y el fago BP' es fenotípicamente Sib^- (gal sustituye a sib), por lo que la expresión de int se incrementará a partir del promotor pL. Posiblemente el número inicial de recombinantes será dependiente de si el fago es sib⁺ ó sib⁻ si se analiza pL; ó de si es cII⁺ ó cII⁻ si se analiza pI en el fago PP'; pero una vez generados los recombinantes BP' los niveles de integrasa se elevarán introduciendo un efecto de ruido (efecto que amplificaría el porcentaje de recombinación). Probablemente esta podría ser una explicación del por qué las diferencias entre cII⁺ y cII⁻ (ó sib⁺ y sib⁻) son menores que las obtenidas en superinfección en los valores de recombinación integrativa y del por qué el valor de la complementación (activación de pI) es mayor (más cercano al valor de cII⁺) que el obtenido en superinfección; también podría ser una explicación para la ausencia del efecto de hfl⁻ en la complementación en las cruzas líticas.

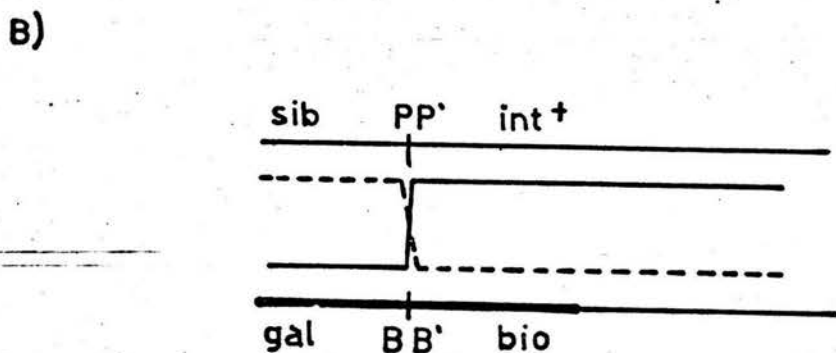
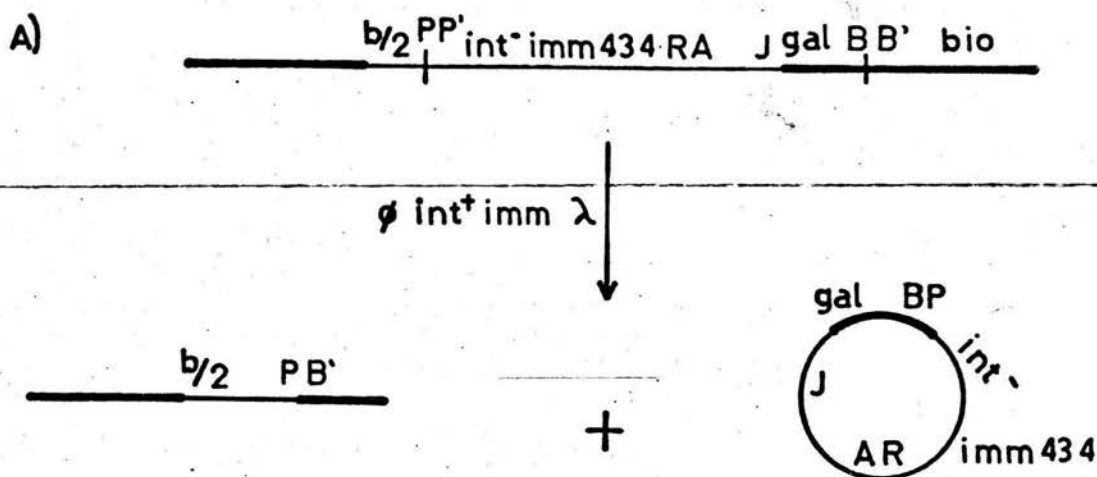


FIG. II-1. ENSAYOS DE RECOMBINACION INTEGRATIVA. Parte A): Ensayo de superinfección. Consiste en la escisión de un profago (λ_{imm434}) promovida por Int , que proporciona un fago auxiliar heteroinmune (λ). Cuando el profago se escinde lleva la sustitución gal. Parte B). Ensayo de cruzá lítica. Es la recombinación entre 2 fagos promovida por Int , que proporciona uno de los fagos recombinantes. - Comparece los sustratos de recombinación, A) intramolecular y B) intermolecular.

Si estas suposiciones son correctas, al efectuar cruza lí-
ticas en condiciones pL^- se esperaría encontrar el efecto de hfl^-
y posiblemente un incremento en la diferencia entre cII^+ y cII^- .

De los valores de recombinación obtenidos en las cruza líti-
cas, también es evidente la actividad leaky de CII68 (los valores
para $cII68$ son mayores (más de 10 veces) que los de $cII41$ (tablas
4 y 8). Esta observación entra en conflicto con lo reportado por
Chung y Echols (1977) quienes obtienen valores iguales para $cII41$
y $cII68$ en cruza similares. Es probable que la clave resida en -
la mdi utilizada; los autores citados utilizaron una mdi de 2 a 4
mientras que la mdi utilizada en el presente trabajo fué de 10 -
(para que la actividad de CII se manifieste se requiere de una -
mdi alta). En superinfección la actividad leaky de CII68 sólo se
manifiesta en condiciones hfl^- (tablas II-7 y II-8).

La actividad leaky de CII68 se ha reportado previamente para
promover lisogenia y es más evidente en cepas hfl^- . La baja fre-
cuencia de lisogenia que se obtiene en hfl^+ se incrementa de 3 a
6 veces en hfl^- (Belfort y Wulff, 1973); por otra parte Belfort
et al (1975) obtienen una mayor actividad de CII68 que de CII41
en lisogenia (3 veces); aunque otros autores no encuentran dife-
rencias entre éstas mutantes para promover la síntesis de las -
proteínas Int y CI (en geles de poliacrilamida son igual de ine-
ficientes, Katzir et al, 1976).

En la complementación entre CII68 y CII41 presumiblemente -
las proteínas de ambos genes se complejan para restaurar cierto

nivel de actividad superior al observado para CII68 sólo. Estos resultados podrían sugerir ya sea una afinidad mayor por la secuencia en el DNA (promotor) de las 2 proteínas combinadas ó un incremento en la estabilidad del complejo que permitiera una mayor actividad.

El hecho de que la complementación en el ensayo de superinfección sólo se observe en condiciones hfl⁻ podría indicar todavía una gran susceptibilidad al ataque proteolítico. De estos experimentos no resulta claro si CIII está involucrado en el fenómeno. Sería interesante utilizar fagos cIII⁻ y probar sus efectos para la complementación.

En contraste a la complementación obtenida para integración, ningún efecto se observa de las coinfecciones cII68/cII41 para represión (aún en condiciones hfl⁻). Este resultado es un poco sorprendente dado lo que se conoce del mecanismo de acción de CII.

La proteína CII activa la transcripción de los promotores pE y pI probablemente por interacción con la región de -35; la secuencia de ambos promotores en ésta región es muy semejante (11 de 14 pb; ver fig. II-2). La transcripción a partir del promotor pE es 4 veces más eficiente que la obtenida para pI (Y. Ho y Rosenberg, 1981). Estas diferencias parecen resultar de la interacción de la RNapolimerasa con los promotores y en el inicio de la transcripción (pE inicia con ATP y pI con UTP). La afinidad de unión de CII a ambos promotores es idéntica.

Una explicación para la diferencia en activación de pI y de pE es que la estructura ó topología donde se encuentran ambos pro

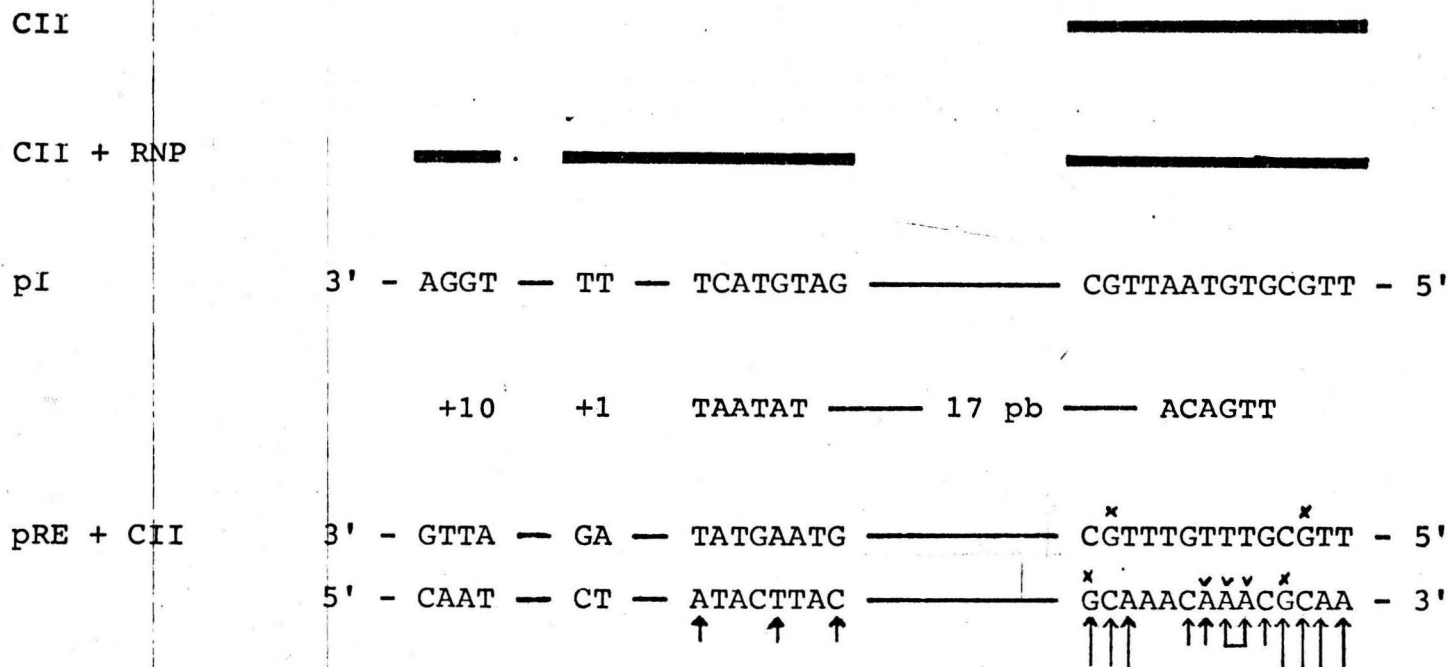


FIG. II-2. UNA COMPARACION DE LAS SECUENCIAS DE LOS PROMOTORES pI y pE.

Los promotores se encuentran alineados con respecto a su sitio de inicio de la transcripción que es dependiente de la proteína CII (posición +1). También, para comparación se muestran las secuencias de reconocimiento de la RNAPolimerasa. Las regiones del promotor protegidas de la digestión por nucleasas se marcan en la parte superior con líneas gruesas negras. Las flechas largas indican las bases dentro del promotor pE que cuando están mutadas afectan la unión de CII. Las flechas pequeñas indican las posiciones que cuando son cambiadas no tienen efecto en la unión de CII. Las bases que afecta CII en metilación se indican (v,x) Ho, 1982.

motores es muy distinta y podría tener efectos funcionales.

El promotor pI se traslapa estructuralmente con los sitios de inicio y reconocimiento de traducción del gene xis (en la misma orientación); mientras que el promotor pE se localiza en una región más compleja. La región del promotor se traslapa estructuralmente con secuencias de DNA que codifican para la iniciación de la traducción y la región NH₂-terminal del gene cII (fig A-2) (Scmeissner et al, 1980; Wulff et al, 1980; Rosenberg et al, 1978). Estos elementos que se traslapan, están orientados en direcciones opuestas. Transcripción de pE procede hacia la izquierda (en dirección del gene cI) mientras que el gene cII se transcribe de pR (hacia la derecha; ver fig. A-2). Tal vez esta regulación diferencial podría afectar la activación por el complejo CII68/CII41; podría suponerse que si la activación es débil, transcripción en sentido contrario (pR) tendría un efecto inhibitorio; algo semejante sucedería con la traducción de cII.

Otra explicación más atractiva, sería que la activación diferencial se debe a que la proteína CII tiene 2 dominios, uno que reconoce pI, y otro que reconoce pE; el complejo CII68/CII41 sólo tendría funcional el dominio de reconocimiento de pI. Esta hipótesis presupone que las pequeñas diferencias entre los promotores pI y pE y/o secuencias vecinas son importantes en las interacciones con CII. A este respecto es relevante mencionar que Hoopes B. (1984) postula que los sitios de unión de CII en ambos promotores es diferente de la reportada anteriormente.

Mientras que el gene para el represor y el promotor pE del

fago lambda y del fago híbrido λ_{imm21} se encuentran en la región heteróloga a ambos, el gene int y su promotor pI están situados en la región homóloga (fig. A-2). La proteína CII del fago λ_{imm-21} es capaz de activar pI del fago λ , pero no pE de este fago - (Oppenheim et al, 1976). Esto podría sugerir 2 dominios en CII, sin embargo no se han aislado mutaciones en el gene cII que sean capaces de activar un sólo promotor. El gene cII de los 2 fagos mencionados anteriormente en su mayor parte tiene una secuencia diferente, excepto en la parte terminal derecha (región - carboxilo) que es muy similar. Esta región podría estar involucrada en el sitio de reconocimiento de pI (Oppenheim et al, 1976). La complementación diferencial de CII68/CII41 podría apoyar la existencia de dominios en CII.

Los resultados obtenidos sugieren que la forma activa de la proteína CII para activar pI es oligomérica (como para la activación de pE; Belfort et al, 1975). Esta información puede también ayudar a entender la relación de CII con los factores que influyen sobre su actividad y pueden ser de relevancia en general para las interacciones entre las proteínas reguladoras y el DNA.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham, J., Mascarenhas, D., Fischer, R., Benedik, M., Campbell A. y Echols, H. (1980). DNA sequence of the regulatory region for the integration gene of bacteriophage λ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 2477.
- Belfort, M. y Wulff, D. L. (1973 a). Genetic and biochemical investigation of the Escherichia coli mutant hfl-1 which is lysogenized at high frequency by bacteriophage lambda. J. Bacteriol. 115: 299.
- Belfort, M. y Wulff, D. L. (1973 b). An analysis of the processes of infection and induction of E. coli hfl-1 by bacteriophage lambda. Virology 55: 183.
- Belfort, M. y Wulff, D. L. (1974). The roles of lambda cIII gene and the Escherichia coli catabolite gene activation system in the establishment of lysogeny by bacteriophage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 779.
- Belfort, M., Noff, D. y Oppenheim, A. B. (1975). Isolation, characterization and deletion mapping of amber mutation in the cII gene of phage λ . Virology 63: 147.
- Campbell, A. M. (1961). Sensitive mutants of bacteriophage lambda. Virology 14: 22.
- Chung, S. y Echols, H. (1977). Positive regulation of integrative recombination by the cII and cIII genes of bacteriophage lambda. Virology 79: 312.
- Court, D., Green, L. y Echols, H. (1975). Positive and negative regulation by the cII and cIII gene products of bacterio-

- phage lambda. *Virology* 63: 484.
- Echols, H. y Green, L. (1971). Establishment and maintenance of repression by bacteriophage lambda: The role of the cI, cII and cIII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68: 2190.
-
- Enquist, L. W. y Weisberg, R. A. (1976). The red plaque test: a rapid method for identification of excision defective variants of bacteriophage lambda. *Virology* 72: 147.
- Feiss, M., Adhya, S. y Court, D. (1972). Isolation of a plaque forming, galactose transducing strain of phage lambda. *Genetics.* 71: 189.
- Fowler, R., Degnen, G. y Cox, E. (1974). Mutational specificity of a conditional Escherichia coli mutator mut 5. *Mol. Gen. Genet.* 133: 179.
-
- Friedman, D. y Gottesman, M. (1983). Lytic Mode of lambda Development. in *Lambda II.* (Hendrix et al, eds.), pp. 21. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Gingery, R. y Echols, H. (1967). Mutants of bacteriophage lambda unable to integrate into the host chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58: 1507.
- Gingery, R. y Echols, H. (1968). Integration, excision, and transducing particle genesis by bacteriophage λ . *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33: 721.
- Gottesman, M. E. y Yarmolinsky, M. B. (1968). Integration-negative mutants of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 31: 487.
- Gndzicker, T., Arditti, R. R. y Eisen, H. (1972). Establishment of repression by lambdoid phage in catabolite activator protein and adenylate cyclase mutants of Escherichia coli. -

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69: 366.

Guarneros, G. y Echols, H. (1973). Thermal asymetry of site-specific recombination by bacteriophage . *Virology* 52: 30.

Guarneros, G. y Galindo, J. M. (1979). The regulation of integrative recombination by the b2 region and the cII gene of bacteriophage λ . *Virology* 95: 119.

Guarneros, G., Montañez, C., Hernandez, T. y Court, D. (1982). Posttranscriptional control of bacteriophage λ int gene - expression from a site distal to the gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 238.

Herskowitz, I. y Hagen, D. (1980). The Lysis-Lysogeny decision of phage : Explicit programming and responsiveness. *Annu. Rev. Genet.* 14: 399.

Ho, Y. y Rosenberg, M. (1982). Characterization of the phage λ regulatory protein cII. *Annu. Microbiol. (Paris)* 133A: 215.

Hoess, R. H., Foeller, C., Bidwell, K. y Landy, A. (1980). Site specific recombination functions of bacteriophage : DNA - sequence of the regulatory regions and overlapping structural genes for Int and Xis. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 2482.

Hoopes, B. (1984).

Hoyt, M. A., Knight, D. M., Das, A., Miller, H. I. y Echols, H. (1982). Control of phage development by stability and synthesis of cII protein: Role of the viral cIII and host hfl A, himA, and himD genes. *Cell* 31: 565.

Jacob, F. y Campbell, A. (1959). Sur le système de répression -

assurant l'immunité chez les bactéries lysogènes. C. R. - Acad. Sci. 248: 3219.

Jones, M. O. y Herskowitz, I. (1978). Mutants of bacteriophage λ which do not require the cIII gene for efficient lysogenization. Virology 88: 199.

Jones, M. O., Fischer, R., Herskowitz, I. y Echols, H. (1979). Location of the regulatory site for establishment of repression of bacteriophage λ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 150.

Kaiser, A. D. (1957). Mutations in a temperate bacteriophage - affecting its ability to lysogenize Escherichia coli. Virology 3: 42.

Kaiser, A. D. y Jacob, F. (1957). Recombination between related temperate bacteriophages and the genetic control of immunity and prophage localization. Virology 4: 509.

Kaiser, A. D. y Masuda, T. (1970). Evidence for a prophage excision gene in λ . J. Mol. Biol. 47: 557.

Katzir, N., Oppenheim, A., Belfort, M. y Oppenheim, A. B. (1976). Activation of the lambda int gene by the cII and cIII gene products. Virology 74: 324.

Kellenberger, G., Zichichi, M. L. y Weigle J. (1961). Exchange of DNA in the recombination of bacteriophage λ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 57: 869.

Kourilsky, P. (1973). Lysogenization by bacteriophage lambda. - I. Multiple infection and the lysogenic response. Mol. Gen. Genet. 122: 183.

Liedke-Kulke, M. y Kaiser, A. D. (1967). Genetic control of pro

phage insertion specificity in bacteriophage λ and 21. *Virology* 32: 465.

Manly, K., Signer, K. y Radding, C. (1969). *Virology* 37: 177.

McDermitt, M., Pierce, M., Staley, D., Shimaji, M., Shaw, R. y -

Wulff, D. (1976). Mutations masking the lambda cin-1 mutation. *Genetics* 82: 417.

McMaken, R., Mantei, N., Butler, B., Joyner, A. y Echols, H. -
(1970). Effect of mutation in the cII and cIII genes of -
bacteriophage λ on macromolecular synthesis in infected -
cells. *J. Mol. Biol.* 49: 639.

Miller, H. I. y Friedman, D. I. (1980). An Escherichia coli -
gene product requerid for lambda site-specific recombina-
tion. *Cell* 20: 711.

Miller, H. I., Mozola, M. M. y Friedman, D. I. (1980). int-h:
An int mutation of phage λ that enhances site-specific re-
combination. *Cell* 20: 721.

Miller, H. I. y Nash, H. A. (1981). Direct role of the himA ge-
ne product in phage λ integration. *Nature* 290: 523.

Miller, H. I., Abraham, J., Benedik, M., Campbell, A., Court, -
D., Echols, H., Fischer, R., Galindo, J. M., Guarneros, G.
Hernandez, T., Mascarenhas, D., Montañez, C., Schindler, -
D., Schmeissner, V. y Sosa, L. (1981). Regulation of the -
integration-excision by bacteriophage λ . *Cold Spring Har-
bor Symp. Quant. Biol.* 45: 439.

Miller, H. I. (1981). Multilevel regulation of bacteriophage λ
lysogeny by the E. coli himA gene. *Cell* 25: 269.

- Montañez, C. (1982). Aislamiento y caracterización de mutantes del bacteriófago lambda que carecen del retroinhibidor sib. Tesis doctoral. ENCB, IPN. México, D.F.
- Oppenheim, A. B. y Kapeller, I. (1976). Analysis of a temperature sensitive mutation in gene cII of bacteriophage lambda. Molec. Gen. Genet. 149: 121.
- Ortega, J. P. (1983). Efecto del regulador distal (sib) sobre la recombinación escisiva del bacteriófago lambda. Tesis magisterial. CINVESTAV, México, D.F.
- Ptashne, M., Backman, K., Humayan, Z., Jeffrey, A., Maurer, R., Meyer, B. y Saurer, R. T. (1976). Autoregulation and function of a repressor in bacteriophage lambda. Science 194: 156.
- Reichardt, L. y Kaiser, A. D. (1971). Control of repressor - synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 68: 2185.
- Rosenberg, M., Court, D., Shimatake, H., Brady, C. y Wulff, D. L. (1978). The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in phage λ . Nature 272: 414.
- Rosenberg, M. y Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Annu. Rev. Genet. 13: 319.
- Salstrom, J. S. y Szybalski, W. (1978). Coliphage nutL⁻: A unique class of mutants defective in the site of gene N product utilization for antitermination of leftward transcription. J. Mol. Biol. 124: 195.
- Schindler, D. y Echols, H. (1981). Retroregulation of the int -

- gene of bacteriophage λ : Control of translational completion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 4475.
- Shmeissner, U., Court, D., Shimatake, H. y Rosenberg, M. (1980). Promoter for the establishment of repressor synthesis in bacteriophage λ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 3191.
- Shulman, M. J., Hallick, L. M., Echols, H. y Signer, E. R. (1970). Properties of recombination-deficient mutants of bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 52: 501.
- Signer, E. R. y Weil, J. (1968). Recombination in bacteriophage λ . I. Mutants deficient in general recombination. J. Mol. Biol. 34: 261.
- Signer, E. R., Echols, H., Weil, J., Radding, C. M., Schulman, M., Moore, L. y Manly, K. (1969). The general recombination system of bacteriophage λ . Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 711.
- Sussman, R. y Jacob, F. (1962). Sur un système de répression thermosensible chez le bactériophage d'Escherichia coli. C. R. Acad. Sci. 254: 1517.
- Takeda, Y., Matsubara, K. y Ogata, K. (1975). Regulation of early expression in bacteriophage lambda: Effect of tof mutation on strand-specific transcription. Virology 65: 374.
- Williams, J., Wulff, D. L. y Nash, H. A. (1977). A mutant of Escherichia coli deficient in a host function required for phage lambda integration and excision. In DNA insertion elements, plasmids, and episomes (Bukhari, A., et al, eds.) pp. 357. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor-

New York.

Wulff, D.L. (1976). Lambda cin-1, a new mutation which enhances - lysogenization by bacteriophage lambda and the genetic structure of the lambda cY region. Genetics 82: 401.

Wulff, D. L., Beher, M., Izumi, S., Beck., J., Mahoney, M., Shi- matake, H., Brady, C., Court, D. y Rosenberg, M. (1980). - Structure and function of the cY control region of bacteriiophage lambda. J. Mol. Biol. 138: 209.

Zissler, J. (1967). Integration negative (int) mutants of phage λ . Virology 31: 189.

La lisogenia de las ideas
(Una ofrenda psico-molecular)

En una atmósfera cargada de fagos
uno no puede evitar respirar
estas partículas misteriosas y extravagantes
(mi mente se satura)

estas parecen sufrir una combinación
con las ideas
una fusión extraña del reino abstracto
con el reino viviente
donde no se perciben los límites.

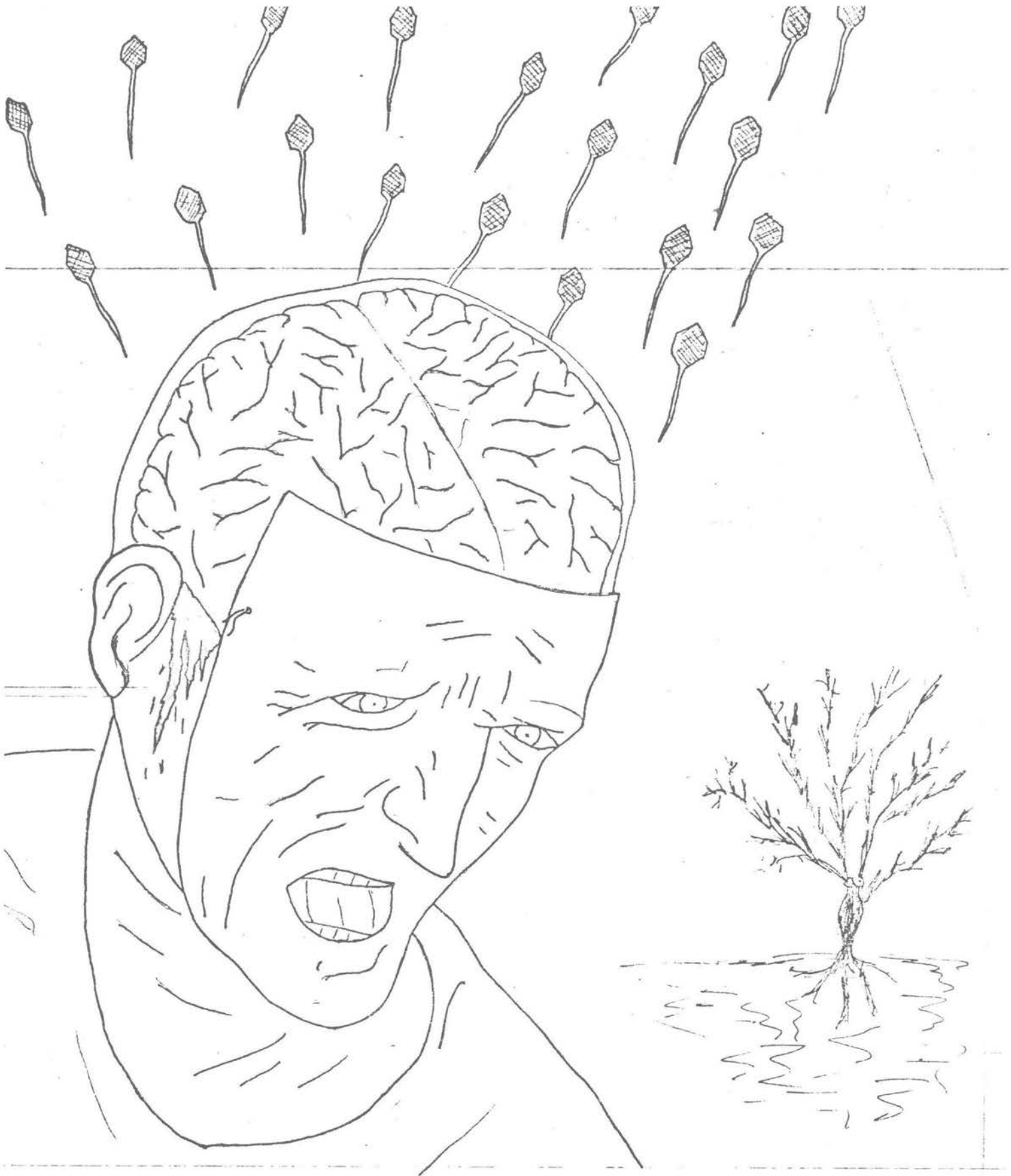
Pensamientos químericos penetran y se
arrastran hasta aquí
algunos pasean sin dejar huella, pero
otros llegan a lo más profundo del alma,
integración herética.

La confusión habita los rincones de mi ser
escucho pero no oigo, el silencio habla.

En el interior de la celda de mi cerebro
están presos los ideales que quieren su
libertad, ¡oh! arquetipos ilusorios
tratan de emerger pero se estrellan contra
las paredes de mi cráneo.

Sendero tortuoso, laberinto enloquecedor,
imaginación solitaria
temblor que sacude mis entrañas
inducción espontánea
ideas fugitivas, a donde irán
¿dónde se posarán?

Benito Estrada



Induccion

E. meyer