

8

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

EL FENOMENO DE LI SOGENIA EN MUTANTES CONDICIONALES
DE TEMPERATURA DEL BACTERIOFAGO Mu-1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO-FARMACEUTICO
Y BIOLOGO

3

PRESENTA:

326

YOLANDA G. SANDOVAL ROMERO

MEXICO. D.F.

1974.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

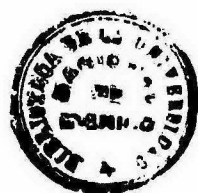
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

CLAS. Desu
AGE 1984
REGNA 1984
PROC Mit ~~298~~

aut ~~301~~
298



QUIMICA

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Oscar Amor, Dodero.
Vocal:	Estela Sánchez de Jimenez.
Secretario:	Francisco G. Bolívar Zapata.
1er. Suplente:	Edmundo Chávez Cosío.
2o. Suplente:	Ana Ma. Gutiérrez Arcos.

Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS,

U.N.A.M.

SUSTENTANTE:

Yolanda G. Sandoval Romero.

ASESOR DEL TEMA:

Francisco G. Bolívar Zapata.

VoBo
[Signature]

INDICE GENERAL

	Pág.
Prólogo. Motivos del trabajo	4
Introducción	6
Materiales y Métodos	32
a) Materiales	32
b) Métodos	36
Resultados	40
a) Construcción de cepas donadoras de Mu cts	43
I Planteamiento Teórico	43
II Obtención de las cepas donadoras para Mu cts ...	44
b) Construcción de una cepa polilisogénica para Mu cts y Monolisogénica para Mu-1	45
I Planteamiento Teórico	45
II Obtención de la célula polilisogénica para Mu cts y Monolisogénica para Mu-1	55
c) Curvas de crecimiento	58
d) Análisis de Inducción espontánea	58
Discusión y conclusiones	68
Bibliografía	73

Prólogo y Motivos del trabajo

Los datos que se conocen sobre el fago Mu_{cts}, mutante condicional de temperatura del fago Mu-1 que codifica para un represor que es termolábil a 42°C, y lo que se ha trabajado en él, es bien poco comparado con otros bacteriófagos temperados como λ (1-6) Es motivo de este trabajo tratar de estudiar algunos aspectos que podrían ayudar a entender más de la genética del -- fago Mu.

Para ello se pensó en la construcción de una célula polisogénica para el fago Mu_{cts}, en donde se insertaría un genoma de Mu-1 y varios genomas de Mu_{cts}, en diferentes loci del cromosoma de E. coli K-12 y esto, por dos razones; una inmediata y una inmediata.

La razón inmediata es ir insertando profagos Mu_{cts} en el cromosoma de E. coli en presencia de un profago Mu-1 y observar el crecimiento, la frecuencia de inducción espontánea, la morfología de las células, etc. conforme aumenta el número de genomas fágicos insertados en el genoma bacteriano. Esto es interesante ya que hay que tomar en cuenta que por cada profago que se inserte se está adicionando 25×10^6 daltones de material genético lo que implica casi el 1% del DNA bacteriano.

Por otro lado, analizar si el represor codificado por el fago Mu_{cts} es dominante ó recesivo respecto al codificado por el Mu-1. Esto se verá al calentar la célula polisogénica Mu-1, Mu_{cts} a 42°C y ver si hay ó nó lisis. Si no hubiera, la pregunta a hacerse sería: ¿Cuál es la cantidad de profagos Mu_{cts} que pueden romper la inmunidad que confiere el profago Mu-1 al elevar la temperatura a 42°C?

Por otro lado, resultaría interesante que la frecuencia de inducción espontánea se modificase conforme creciera el número de profagos en el genoma bacteriano ya que, esto estaría relacionado con la razón mediata de construir esta célula: el aislamiento del represor del fago Mu.

INTRODUCCION

Los bacteriófagos fueron descubiertos independientemente por Twort en Inglaterra y d' Herelle en Francia. Por mucho tiempo permanecieron como una curiosidad de laboratorio, hasta que Max Delbruck revivió el interés en ellos al introducirlos como un nuevo método en las investigaciones biológicas como material de experimentación.

El sistema de bacteria-fago, tiene grandes ventajas sobre otros sistemas de virus-huesped y las más importantes son:

- 1) A diferencia de otros virus, cada partícula de fago tiene una probabilidad cercana a uno de causar infección a un huesped -- particular.
- 2) Las partículas infecciosas pueden ser contadas de una manera sencilla y reproducible, de tal manera que los resultados -- pueden ser expresados cuantitativamente.
- 3) Las bacterias son susceptibles de ser estudiadas por análisis químico cuantitativo durante los procesos de la infección, de tal manera que puede estudiarse la cinética química del proceso.
- 4) La constitución genética de los fagos y bacterias, así como su interacción, son fácilmente accesibles al análisis genético.
- 5) En condiciones óptimas, el tiempo de duplicación de las bacterias es de 20 min. Lo que permite 36 generaciones en sólo 12 horas.
- 6) El genoma de las bacterias es haploide, con lo cual se evitan los problemas de genes recesivos y dominantes.

Una clasificación de los bacteriófagos, se basa en la forma de interacción con la bacteria huésped y de esta manera se dividen en dos grandes grupos:

- a) Fagos virulentos y
- b) Fagos temperados

Los bacteriófagos virulentos, por ejemplo T₂ y T₄, se caracterizan porque invariablemente lisan a la bacteria que infectan, no existiendo otra alternativa que seguir lo que se ha denominado como ciclo lítico ó vegetativo. Por lo anterior se conoce a éstos fagos como virus líticos.

Experimentos de Hershey y Chase en 1952, en los cuales rompían las bacterias infectadas por un virus lítico a diferentes lapsos de tiempo con el fin de analizar los componentes virales y la relación en que éstos se encuentran dentro de la célula. (4)

Siempre es posible, después de los primeros 10 mín. de infección encontrar partículas, aunque no completamente ensambladas.

En cambio, los fagos temperados tienen dos alternativas a seguir, ó siguen el ciclo lítico a semejanza de los fagos virulentos ó establecen una relación más ó menos permanente con la bacteria huésped sin lisarla, lo que da como resultado la perpetuación del material genético del fago conjuntamente con los descendientes de la bacteria. De este modo se establece el fenómeno de lisogenia y aquellas bacterias que contienen el genoma de un fago temperado reciben el nombre de lisogénicas, mientras que el genoma del fago en éste estado recibe el nombre de profago (7).

Si a un cultivo de bacterias sensibles se le adiciona - fagos virulentos, después de un intervalo de tiempo que es - variable según el tipo de fago y las condiciones experimenta - les, el cultivo que normalmente es turbio se aclara como re - sultado de la infección y lisis que se presenta en casi toda la población de bacterias. Sin embargo si se continúa incu - bando, reaparece la turbidez después de algún tiempo debido al crecimiento de bacterias pre-existentes y que son resis - tentes a la infección.

La infección con fagos temperados en condiciones simila - res conduce a la reducción transitoria de la turbidez la cual es rápidamente restaurada por el crecimiento de las bacterias que han sido lisogenizadas por el fago y que por lo tanto han adquirido la inmunidad a infecciones subsecuentes.

En la mayoría de las células de una colonia de bacterias lisogénicas, no se encuentran viriones adultos ni proteínas - virales y únicamente se localizan en la fracción de células - que espontáneamente ó por inducción han dejado de ser lisogé - nicas, con la subsecuente formación de una población de fagos.

Los fagos infectivos pueden ser contados mezclando un - pequeño volumen de una dilución adecuada de la suspensión de fagos con unas cuantas gotas del cultivo de bacterias sensi - bles y dado que las bacterias se encuentran en exceso, cada - uno de los fagos infectará a una sola bacteria. La mezcla es distribuida sobre la superficie de una caja de agar nutriti - vo, para formar una película confluyente de células sobre la superficie de la caja.

Sin embargo, cada una de las bacterias infectadas con el fago, se lisa y libera nuevas partículas fágicas que inmediatamente infectan a las bacterias vecinas las cuales a su vez son lisadas y liberan nueva progenie fágica. Este fenómeno -- repetido muchas veces da como resultado la formación de una placa que destaca sobre el crecimiento confluyente de las bacterias.

Los fagos temperados producen placas turbias debido al crecimiento de las bacterias lisogénicas en el seno de la --- placa. Contando el número de placas producidas se puede calcular el número de fagos por unidad que contiene la suspensión original y que son capaces de formar placas (Unidades Formadoras de Placas) mediante la fórmula siguiente:

$$UFP = \frac{\text{Número de placas}}{\text{Dilución X Volumen de la dilución añadido}}$$

esto es llamado el título de plaqueo de la suspensión.

Propiedades de las bacterias lisogénicas.

Las bacterias lisogénicas ó sea aquellas que contienen material genético de uno ó más bacteriófagos, presentan dos -- características que son muy importantes:

- 1) Liberan fagos espontáneamente y es una característica que es hereditaria.
- 2) Son inmunes a la infección por el mismo fago ó por otros -- relacionados a él. (1)

Inducción Espontánea de fagos en una cepa lisogénica.

Se ha observado que en todos los cultivos de bacterias -

lisogénicas se encuentran partículas de fagos libres y no ha sido posible disociar una de otra. Existen dos posibilidades para explicar esto: Que las partículas infecciosas que se encuentran presentes en cada una de las bacterias infectadas, sean continuamente liberadas al medio, o bien que la relación de equilibrio fago-bacteria se rompa en una pequeña proporción de la población de tal manera que sobrevenga el ciclo lítico.

Se ha demostrado que cuando se rompen artificialmente las bacterias lisogénicas estas no contienen partículas infecciosas (2-4). Además se ha demostrado más allá de todas dudas que la bacteria lisogénica tiene la potencialidad de generar partículas fágicas y que esta característica es heredada a toda la progenia de las bacterias. (7)

Por lo tanto cualquier bacteria de un cultivo lisogénico hereda la capacidad de liberar fagos, pero esta capacidad es expresada sólo a muy baja frecuencia y que varía según las diferentes cepas entre 10^{-2} a 10^{-6} por células por generación.

Inducción del Profago

Lowff y Gutman (21), observaron que la liberación de fagos variaba de experimento en experimento, de donde dedujeron que la liberación de fagos podía también ser inducida por agentes externos y ellos encontraron que la luz ultravioleta inducía la lisis en casi la totalidad de las bacterias de un cultivo lisogénico de B. megaterium. Desde entonces muchos otros agentes inductores han sido descubiertos y entre ellos se encuentran los rayos X, los rayos gamma, las mostazas nitrogenadas, el ayuno de timina, etc. Todos estos tratamientos

tienen la característica en común de que inhiben la síntesis de DNA,

Nó todos los fagos son inducibles por los agentes mencionados anteriormente ya que ésta capacidad parece ser una propiedad de la constitución genética del fago y no de la bacteria, ya que se sabe que en una cepa bacteriana isogénica para un fago como λ , éste se induce y en la misma cepa bacteriana otro fago como Mu-1 no es inducible.

En E. coli se ha logrado comprobar la asociación física entre algunos profagos y el cromosoma de la bacteria, gracias a experimentos de conjugación bacteriana y Microscopía electrónica (22) y se ha demostrado que se encuentra insertado en el cromosoma. (20)

De acuerdo con esto podemos considerar al profago como un marcador genético y puede ser mapeado en el cromosoma de la bacteria debido a la unión específica que lleva a cabo con otros marcadores.

En esta forma muchos sitios en donde se insertan diferentes profagos han sido localizados en el cromosoma de E. coli (Fig. 1)

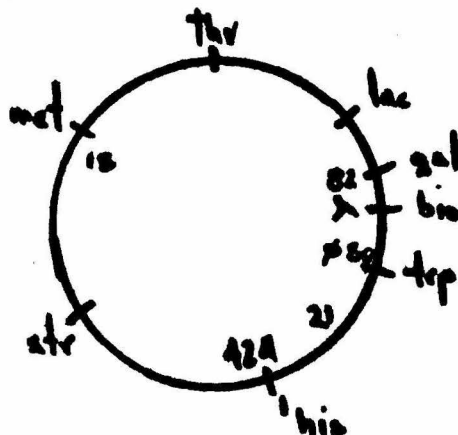


Fig.1 Mapa del cromosoma de E. coli K-12 que muestra los sitios de inserción de algunos profagos.

Muchos fagos temperados tienen únicamente un sitio de -- inserción en el cromosoma de la bacteria huesped, siendo éste el caso específico del profago λ . Hay otros, como P_2 para el -- cual hay una variedad de ellos (nueve). El μ -1 en cambio --- tiene un número muy grande de sitios de inserción al igual - que el mutante condicional de temperatura de éste, el μ cts - como se demostrará posteriormente.

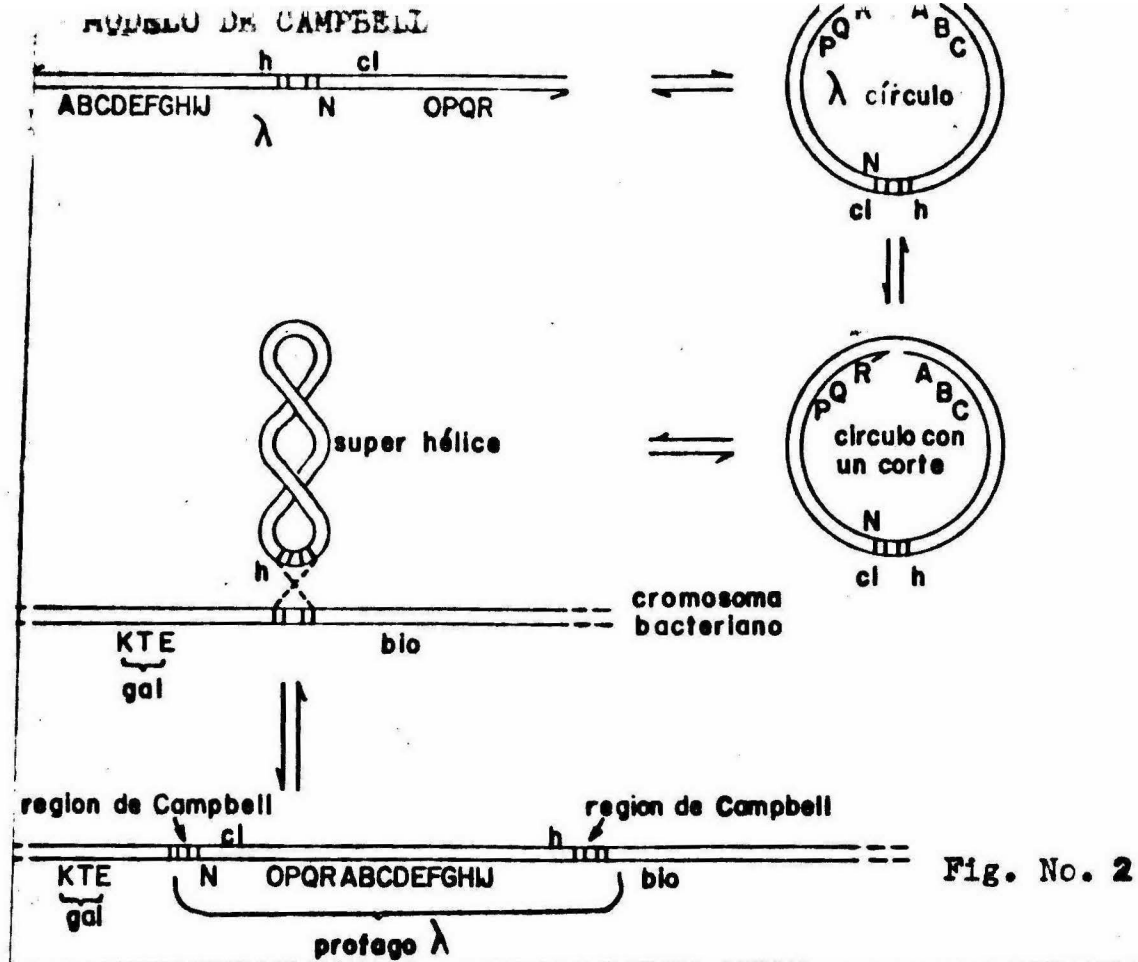
Ahora bien, conociendo que el profago por algún mecanismo se inserta al cromosoma de la bacteria, vale la pena mencio-- nar el mecanismo propuesto por Campbell para la inserción de profagos en el cromosoma bacteriano. (3, 20).

Campbell propuso que, inmediatamente después de que la - molécula de DNA fágico entra en la célula, se circulariza.

Este círculo se aparea con el cromosoma en la región - donde se insertará posteriormente. Se lleva a cabo un entre-- cruzamiento y esto da lugar a la inserción del profago en el cromosoma de la bacteria. Se regresa a la secuencia vegeta-- tiva por el proceso de escisión.

Existen varias evidencias que soportan este modelo de -- integración y entre ellas, las más interesantes son las siguien-- tes:

- 1) En el caso del profago λ se ha podido conocer la secuen-- cia de los genes que integran su cromosoma y se sabe que la secuencia de los marcadores, en el fago integrado, es dife-- rente a la del fago vegetativo (es decir sin integrarse) (23).



- 2) El profago $\phi 80$ que es muy semejante a λ se inserta cerca del operón de triptofano en E. coli y puede ser mapeado con respecto a los genes de tryp, gracias a un tipo de mapeo por deleciones. Nuevamente el mapa del profago está de acuerdo a la hipótesis de Campbell. (6).
- 3) Se han aislado mutantes por deleción de los fagos λ y $\phi 80$ que han perdido un segmento del genoma fágico en el cual está la región de unión al cromosoma bacteriano. Estos fagos son capaces de reproducirse vegetativamente pero no son capaces de integrarse. (15)
- 4) La integración del profago parece deberse a la acción de enzimas específicas codificadas por el fago; han aislado mutantes de este tipo. (28).

- 5) Fotografías con el microscopio electrónico que muestra el cromosoma del bacteriófago λ como un círculo (25) antes de integrarse y después de la inducción.
- 6) Evidencias físicas de la integración lineal del bacteriófago, Mu-1 en bacterias lisogénicas. (22)

Regulación en Profagos.

Como se mencionó brevemente en el momento en que un bacteriófago temperado infecta una célula bacteriana, le inyecta su material genético y éste puede seguir dos alternativas, dentro de la célula huésped:

- 1) El estado vegetativo, en el cual el genoma fágico se multiplica autónomamente, sintetizándose durante el proceso partículas fágicas infecciosas que son liberadas por la lisis de la célula huésped.
- 2) El estado de profago, en el cual el material genético del fago se inserta en el cromosoma de la bacteria, en sitios - específicos ó nó dependiendo del bacteriófago, de tal forma que ambos elementos genéticos se replican como una sola unidad.

Mientras que el profago permanezca integrado, no se producen partículas fágicas y la célula se replica, dando lugar a -- una colonia lisogénica. Para que una bacteria lisogénica pueda producir partículas fágicas, el material genético del fago debe escindirse del cromosoma bacteriano y pasar al estado vegetativo.

El estudio de genomas fágicos defectuosos, en los cuales -- una mutación ha alterado uno de los pasos requeridos para la -- producción de fagos indica, por lo menos, la existencia de dos grupos distintos de funciones virales, ambos relacionados con --

la capacidad de sintetizar proteínas específicas. Algunas proteínas tempranas ó primarias parecen ser un prerrequisito para la función vegetativa mientras que funciones posteriores ó --- tardías codifican para la síntesis de proteínas estructurales de la cabeza, cola, cuello, etc.

Una vez que el estado adoptado por el genoma fágico es -- el vegetativo, no puede ya pasar al de profago, de lo que se -- deduce que la decisión debe tomarse antes de sintetizar las -- proteínas tempranas, es decir, debe ser consecuencia de la interacción de proteínas sintetizadas muy inicialmente por el -- material genético del fago, con el medio bacteriano presente.

Ahora bien, en las bacterias lisogénicas, ocurren una --- serie de fenómenos muy interesantes y entre ellos se encuen -- tran la inmunidad específica y la inducción cigótica.

Inmunidad Específica

Las bacterias lisogénicas, poseen la propiedad de ser específicamente inmunes a todos aquellos bacteriófagos, cuyos genomas estén ya presentes en el interior de la célula, en estado de profago. Cuando células lisogénicas son infectadas por -- fagos homólogos ocurre que estos fagos inyectan su DNA, pero -- éste no se expresa, permaneciendo inerte y siendo diluido conforme la replicación celular continúa. (11).

De acuerdo con esto, la inhibición de funciones fágicas -- en bacterias lisogénicas incluye, además del profago, a todos los genomas homólogos y depende de la presencia del profago en el interior de la célula, ya que si éste se pierde, las bacterias se vuelven sensibles nuevamente.

Inducción Cigótica

La idea de una inmunidad específica provino de la observación de que las conjugaciones entre cepas lisogénicas y no lisogénicas se ven profundamente influenciadas dependiendo de que el profago sea transportado por la Hfr (donador macho) - ó por la F⁻ (receptora hembra).

Por ejemplo cuando la Hfr es lisogénica para un fago inducible tal como lambda, tan pronto como el genoma del profago penetra en la célula receptora sensible al fago, éste entra al estado vegetativo y se multiplica de manera que lisa - al cigoto después de un tiempo y libera partículas fágicas; - este cigoto constituye un foco de infección que puede ser observado por la formación de una placa si se siembra sobre una cepa sensible. A éste fenómeno se le conoce como inducción - cigótica (12). En la cruce opuesta, donador no lisogénico y - receptor lisogénico ó cuando ambos padres son lisogénicos no ocurre la inducción cigótica.

Por lo tanto, la inducción cigótica debe ser determinada por el citoplasma de la célula receptora ya que cuando el profago es introducido al citoplasma de una bacteria no inmune - es cuando ocurre la transición del estado de profago al estado vegetativo.

De esto se sigue que en la bacteria lisogénica se encuentra presente una sustancia citoplásmica que confiere la inmunidad y que es sintetizada bajo la dirección del profago, ésta sustancia no sólo interfiere con la función vegetativa en la superinfección con fagos del mismo tipo ú homólogos, sino que

también es responsable de mantener al profago como tal.

Cuando la sustancia no se encuentra presente ó es inactivada en el citoplasma de la bacteria, automáticamente el profago pasa al estado vegetativo.

La sustancia citoplásmica ha sido denominada represor, el sitio de acción del represor no son los genes estructurales en sí, sino una región adyacente a éstos genes y que se conoce como el operador y cuya función es la de conectar ó desconectar la actividad de los genes estructurales dependiendo de la ausencia ó presencia del represor.

A nivel molecular parece que el operador es el sitio que controla la transcripción de los genes estructurales por la RNA polimerasa. Si el operador es bloqueado por el represor, no hay RNA mensajero y en consecuencia cesa la síntesis de las proteínas codificadas para éstos genes estructurales, impidiendo con ésto la adopción del estado vegetativo por el genoma fágico. Posteriormente, el material genético del virus, se inserta en el cromosoma bacteriano gracias a una recombinasa producida por el mismo fago, pasando al estado de profago.

Además, es probable que la síntesis del represor sea constitutiva como lo es en el caso del represor de la lactosa y éso permita que, en el citoplasma, se encuentren moléculas de represor.

En la inmunidad específica, el represor molecular se encuentra en el citoplasma, y se calcula para el caso del fago λ que existen 10 moléculas por célula.

Cuando el genoma de un fago homólogo es inyectado, actúa sobre él, reprimiendo la síntesis de las proteínas tempranas; además, permanece unido, permitiendo que se diluya durante el crecimiento celular.

En el caso de la inducción cigótica, cuando el profago, - que en el donador debe tener unido el represor para impedir su escisión del cromosoma bacteriano y posterior multiplicación - vegetativa (20) es introducido a la hembra, no lleva al represor, ya que se ha demostrado que durante la conjugación no pasa más que material genético y ningún otro tipo de sustancia. Una vez en el receptor al no tener represor el profago - se escinde del cromosoma y entra al ciclo vegetativo, lisando tiempo después a la célula receptora.

Intercambio Genético

Los procesos de intercambio genético en las bacterias se llevan a cabo principalmente por tres mecanismos: Transducción por fagos, Conjugación y Transformación. En cada uno de éstos procesos una porción de material genético de una célula donadora es introducida en una célula receptora, la cual se convierte temporalmente en un cigoto parcialmente diploide y mediante una recombinación genética surgen las clonas de recombinantes que tienen características de ambos padres.

Transducción genética por fagos

En 1952, Zinder y Lederberg (27) descubrieron que el primer fago transductante temperado PLT 22, conocido actualmente como P 22 de Salmonella typhimurium, era capaz de transferir

transferir marcadores genéticos, entre diferentes cepas bacterianas de S. typhimurium. Este fenómeno consiste en la --- transferencia de material genético de una bacteria que actúa como donadora a otra bacteria que es la receptora, por medio del bacteriófago que funciona como vector.

Esto es, cuando un fago transductante infecta a una bacteria se multiplica dentro de ella y es durante su formación cuando se incorporan pequeños segmentos del cromosoma bacteriano en las cabezas de algunos fagos.

Cuando esta partícula transductante infecta a una célula receptora inyecta el material genético del donador y la célula receptora se convierte temporalmente en un cigoto que posteriormente dará origen a una célula recombinante.

Cuando el fago P 22 se propaga sobre una cepa silvestre (propotrofa) que puede crecer en un medio mínimo) de S. typhimurium y con las partículas fágicas de esta infección se infectan varias cepas mutantes que difieran del tipo silvestre en alguna característica nutricional, fermentativa, resistencia a fagos, etc., se obtienen bacterias de tipo silvestre que pueden ser seleccionadas con una frecuencia aproximada de una por cada $10^5 - 10^6$ partículas fágicas presentes.

Cuando se utilizan cepas receptoras que contienen varias mutaciones se obtienen transductantes de tipo silvestre para cada uno de los marcadores seleccionados con casi la misma frecuencia, pero el resto de los marcadores permanecen mutados, esto es cada marcador se transfiere de manera independiente.

Este fenómeno de transducción, es una propiedad de muchos bacteriófagos temperados, de diferentes tipos de bacte-

rias, incluyendo pseudomonas, bacilos, micobacterias, etc.

Gracias a este fenómeno ha sido posible realizar una serie de experimentos genéticos, usando el bacteriófago P1 como fago transductante en E. coli (18).

El tipo de transducción realizada por el fago P 1, en el que cualquier marcador cromosómico tiene igual oportunidad de ser incorporado en la cabeza del fago, es denominado transducción generalizada.

Por otro lado, el fago lambda que tiene un sitio único de inserción en el cromosoma de E. coli solamente puede transducir los genes inmediatamente adyacentes al sitio de inserción del profago y que son los operones de bio y gal; por esto se le ha denominado como transducción especializada o restringida. Estos dos sistemas de transducción difieren en el mecanismo por medio del cual se incorpora el material genético bacteriano en la partícula transductante.

En un cultivo de E. coli lisogénico para λ , cada célula transporta al profago integrado en el cromosoma en un sitio adyacente al operón de gal por uno de sus extremos y al operón de bio por el otro. Cuando el cultivo es tratado con luz ultravioleta, en cada una de las células, el profago se induce y queda libre en el citoplasma. Sin embargo, como un evento muy raro la liberación del profago es anormal, realizándose un entrecruzamiento entre el ADN viral y el ADN bacteriano, de manera que se genera un círculo de DNA que está compuesto principalmente del genoma de lambda pero que también contiene un segmento de DNA bacteriano, estos elemen

tos cuando son introducidos en la cabeza de un fago producen las partículas llamadas λ_{dg} ó λ_{db} , ésto es, un fago lambda defectuoso que transporta los genes del operón de gal ó de - bio.

Por otro lado, en la transducción generalizada las partículas fágicas transductantes no contienen DNA fágico detectable y parecen estar constituidas únicamente de DNA bacteriano ensamblado en la cabeza del fago. Entonces un lisado - producido por un fago transductante generalizado contiene dos tipos de partículas: una mayoría que contiene únicamente DNA fágico y una minoría (las partículas transductantes) que -- contienen únicamente DNA bacteriano.

La diferencia, en la naturaleza del DNA, entre las partículas de la transducción especializada y las partículas de la transducción generalizada es consistente con la manera en que es formado el lisado transductante. Si el fago lambda es crecido por un ciclo lítico sobre una bacteria sensible no se obtienen partículas λ_{dg} . Para obtener tales partículas -- es necesario obtener el lisado por inducción de un cultivo - lisogénico para lambda, es decir, el fago lambda debe estar - necesariamente en un estado de profago. Por otro lado, las - partículas de la transducción generalizada pueden ser obtenidas por ejemplo con el fago P 1 por infección directa so-- bre la bacteria sensible, el lisado así obtenido tiene pro-- piedades transductantes. Estas diferencias están relacionadas con las diferencias en el estado de pprofago de λ y P1.

Cotransducción

La cotransducción es un fenómeno por el cual dos genes bacterianos independientes pero separados por distancias no mayores de 58 millones de daltones pueden ser transferidos simultáneamente por una partícula transductante, de tal manera que las frecuencias de cotransducción serán mayores a medida que los genes se encuentren más cercanos entre sí y biceversa.

El segmento mayor de cromosoma bacteriano que puede ser transducido por el fago P 1 corresponde al 2% del genoma bacteriano total, es decir, aproximadamente 58 millones de peso molecular en material genético. (9); el fago P 1 puede también transducir el profago de algún otro fago, tal como λ ó Mu-1.

Posible mecanismo de Transducción

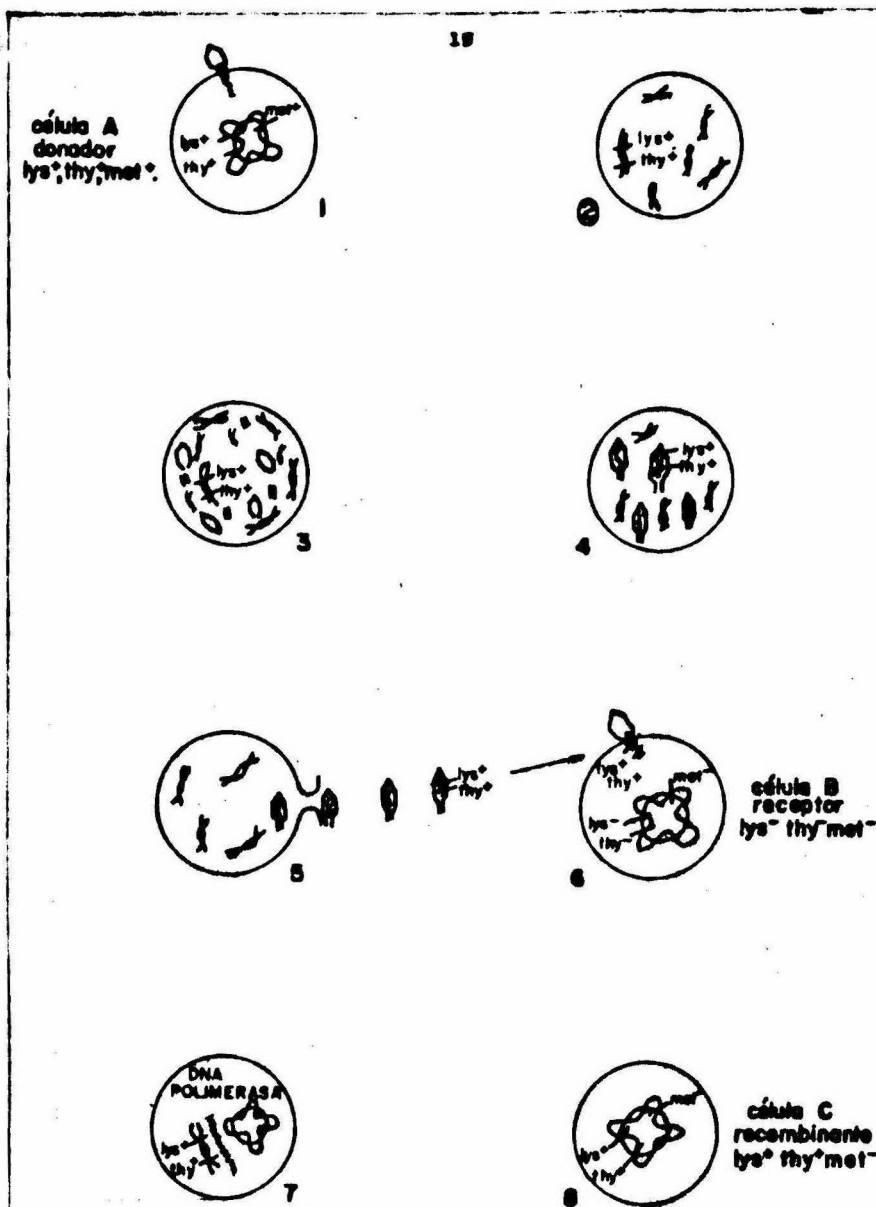
El fago P 1 al infectar a una bacteria sensible, inyecta su DNA y una vez dentro de la célula, el DNA fágico genera el rompimiento del cromosoma bacteriano en fracciones de diferentes tamaños, algunas de las cuales serán aproximadamente del mismo peso y tamaño del DNA fágico. Al mismo tiempo que se rompe el DNA bacteriano, se replica el DNA fágico y se inicia la síntesis de proteína del fago, necesarias para la formación de la cabeza, vaina, cola, etc., los procesos de ensamblaje de éstas estructuras producen los viriones maduros; pero es posible también que los fragmentos de DNA bacteriano que tengan el mismo peso y tamaño que el DNA fágico sean ensamblados en lugar de DNA viral, dando así lugar a la formación de una partícula transductante que contiene únicamente DNA bacteriano en su cabeza.

La bacteria se lisa y se liberan los fagos entre los cuales se encuentran las partículas transducentes, que pueden introducirse en alguna célula que se infecte.

Al infectar con este lisado a las bacterias auxótrofas para ciertos marcadores, por ejemplo leu^- , la partícula transducente introduce el DNA bacteriano el cual mediante un proceso de recombinación con el genoma del receptor dará lugar a la formación de una bacteria recombinante leu^+ .

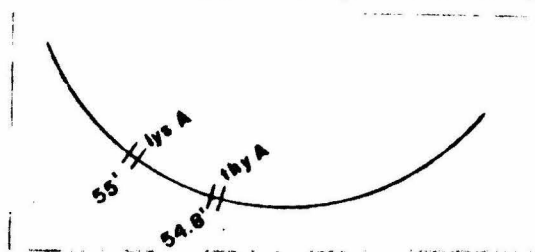
Diagrama del Mecanismo de transducción

Fig. No. 3



Ahora bien, si el material genético del fago Mu-1, pesa aproximadamente 25×10^6 , ó sea el 1% del DNA bacteriano, es importante tener en cuenta que cuando se quiera transducir este profago, habrá que pensar en tener marcadores cotransducibles a distancias DNA no mayores del 1% de cromosoma bacteriano (más ó menos 1 mín.) yá que esto suma 2%, del cromosoma bacteriano, material que como máximo puede ser englobado por P1.

Ejemplo: el gene *thyA* se localiza en el mín 54.8. El gene *lysA* se localiza en el mín 55 del genoma de *E. coli*. Fig. No. 4



Si se logra introducir el profago Mu cts en el gene de *thyA* y comprobar su existencia en ese locus, se tendría el esquema que se aprecia en la siguiente fig.

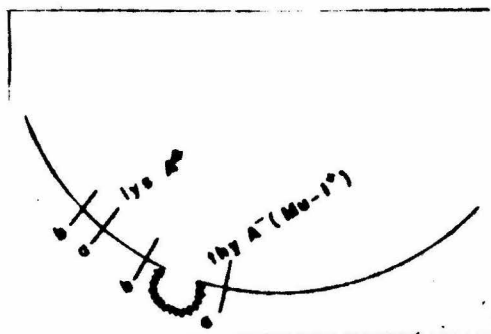


Diagrama del gene *thyA* con el profago Mu integrado. Fig. No.5

La inserción del profago aleja la zona, "a" del gene -- *thyA* en, más ó menos, un minuto de cualquier otra zona posterior a la inserción, esto quiere decir que la frecuencia ---

de cotransducción de los genes $lysA^-$ $thyA^-$ será menor que - cuando no estuviera insertado el profago.

Si ahora, se crece el P1, en esta célula y se fracciona antes de la zona "a" de $thyA$ y después de la "b" de $lysA$ y - este fragmento corresponde al 2% del DNA bacteriano, existe la posibilidad de que sea ensamblado en una cabeza del fago P1 y que posteriormente, sirva para infectar a otra célula.

Supongamos que esta partícula transductante infecta a - una célula $lysA^-, thyA^+$.

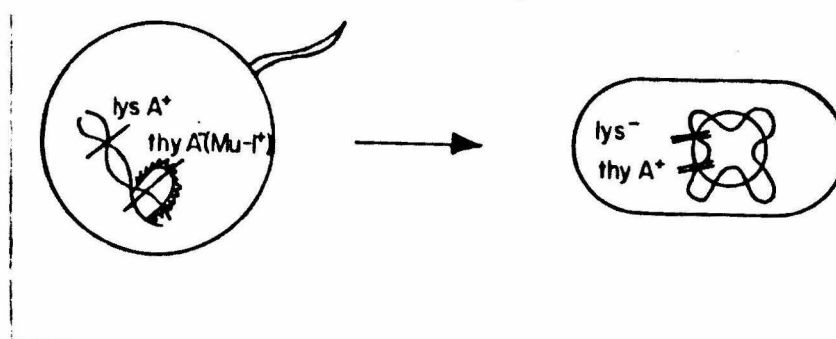


Fig 6 La partícula transductante lys^+thyA^- ($Mu-1^+$) infecta -- una célula receptora lys^-thyA^+ .

Y que sucede una recombinación, en la cual, los recombinantes heredan el material genético que iba en la cabeza del fago transductor, volviéndose lys^+thy^- ($Mu-1^+$).

Para seleccionar estos recombinantes, hay que crecer a - las células en un medio sin lisina y con timina; todas aquellas células que no heredaron el gene $lysA^+$, no crecerán; ~~no~~ todas las lys^+ serán thy^- , en este caso.

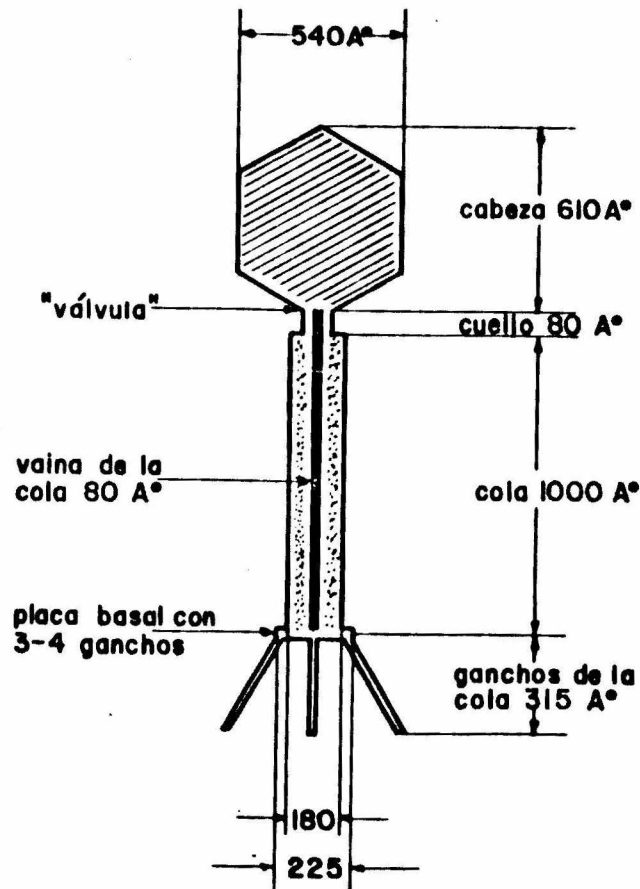
Fago Mu-1

El fago Mu-1 fué descubierto casualmente al hacerse pruebas de lisogenia en una cepa de E. coli que previamente había sido expuesta al fago P1. El caldo de un cultivo de esa cepa de E. coli tratado con cloroformo, fué sembrado en cepas indicadoras de Shigella dysenteriae, para titular el fago P1, en estado libre. Sorprendentemente, ninguna de las placas que -- aparecían después de incubar, tenían las características morfológicas del fago P1. Fagos tomados de estas placas, infectaban con igual eficiencia, cepas P1 lisogénicas y no lisogénicas, y , además, el antisuero de P1 no inactivaba este fago. Lo anterior nos indica que el fago Mu-1 no está relacionado -- con el fago P1.

El bacteriófago Mu-1 (24) tiene la propiedad interesante de ser extremadamente mutagénico. Cuando un cultivo de E. coli es infectado por Mu-1, se encuentra una alta frecuencia de mutación, en diferentes genes del genoma del huésped.

El fago Mu-1 fué purificado por centrifugación diferencial y una posterior centrifugación en gradientes de CsCl (26), examinado por microscopía electrónica, reveló las siguientes -- dimensiones: La cabeza del fago tiene un diámetro de $540 \text{ \AA}$ -- con apariencia octahédrica, aunque pudiera ser un icosaedro. La cola contraída mide $1000 \times 180 \text{ \AA}$, mientras que extendida $556 \times 225 \text{ \AA}$. Se presentan estriaciones en la cola, con una separación entre cada dos de $40 \text{ \AA}$. La vaina interna de la cola, mide $1080 \text{ \AA}$ y tiene un diámetro externo de $80 \text{ \AA}$ y uno interno de $27 \text{ \AA}$. La placa basal tiene un diámetro de $225 \text{ \AA}$ y de ésta parten dos ó tres fibras con un largo de $315 \text{ \AA}$ (5)

Fig. No.7 DIMENSIONES DEL BACTERIOFAGO Mu-1



Estudios del DNA del fago Mu-1 obtenido por extracción fenólica, indican una naturaleza de doble hélice y una relación $\frac{G+C}{A+T} = 0.51$. Experimentos de Torti et al (26) y Martuscelli-Taylor (22) indican que el peso molecular del genoma del fago es 25×10^6 daltones.

Como se dijo en un principio, el fago Mu-1 es extremadamente mutagénico cuando el huésped es *E. coli* K-12; existen datos (24) que demuestran que se requiere una previa lisogenización para que se induzca la mutación. Esto sugirió que la mutación era el resultado de una asociación física entre el genoma del huésped y el genoma viral. Martuscelli y Taylor, (22) demostraron por experimentos de conjugación, que el genoma

fágico se integra en el genoma bacteriano en la misma forma que el profago de λ con la salvedad de que mientras el sitio de inserción del profago de λ es único en el cromosoma de la bacteria, la inserción del profago de Mu-1 es inespecífica, siendo ésta la causa de la mutagenicidad. Se observó --- también que una cepa lisogénica para Mu-1 era inmune a nuevas infecciones por el fago y que, en experimentos de conjugación, existía el fenómeno de inducción cigótica. Estas dos observaciones hablan sobre la posible existencia de un represor análogo al del sistema del profago λ .

Poussant obtuvo una mutante de Mu-1 mutagenizándolo con NTG. Al incubar a 42°C obtuvo alguna placa clara, lo que significa ausencia de lisogenia.

Sin embargo el fago obtenido de estas placas, era capaz de lisogenizar a *E. coli* a 32°C , lo cual eliminaba la posibilidad de un fago mutante virulento y a este fago lo llamó Mu cts mutante condicional de temperatura del bacteriófago Mu-1.

Conjugación

Los procesos sexuales en las bacterias fueron descubiertos en 1946 por Lederberg y Tatum (16) al observar la formación de recombinantes protótrofos a partir de una mezcla de diferentes mutantes auxótrofos de *E. coli* K-12. La frecuencia con la que surgían estas recombinantes protótrofas era cercana a 1 en 10^7 células progenitoras. Se demostró que la formación de recombinantes requería el contacto directo de las dos cepas progenitoras ya que el sobrenadante ó los filtrados de cada una de las cepas era incapaz de producir recombinantes cuando se mezclaban con células de la otra cepa.

Además, no se formaban recombinantes cuando los cultivos de las dos cepas progenitoras eran colocadas en brazos diferentes de un tubo en U dividido por un filtro que evitaba el paso de las sustancias contenidas en el medio de cultivo (16). En estas mezclas de bacterias, una cepa de E. coli se comportaba como donador de material genético (F^+) la cual eventualmente originaba las clonas recombinantes.

Posteriormente se encontró que algunas cepas aisladas de poblaciones de F^+ se comportaban de manera diferente cuando se les mezclaba con poblaciones de F^- . La diferencia radicaba en el número de recombinantes producidas. En esta cruce era de 10^3 a 10^4 veces mayor que en las cruces entre F^+ y F^- , por lo cual a ésta cepa se le denominó Hfr (alta frecuencia de recombinación).

La diferencia entre las células F^+ y F^- reside en un factor denominado F ó factor de fertilidad, el cual es un episoma de DNA, circular y que determina las características del donador. Este factor puede ser transferido a las células receptoras independientemente del cromosoma bacteriano, es decir, la célula receptora puede convertirse fácilmente en donadora en las cruces $F^+ \times F^-$ mediante la obtención del factor F (8,17). En cambio en las cruces Hfr $\times F^-$ la mayoría de las células receptoras permanecen como F^- y sólo unas cuantas heredan la característica de Hfr, estas cruces proporcionan una fuerte evidencia de que el factor F se encuentra como un elemento citoplásmico autónomo en las células F^+ .

Durante la conjugación, el factor F promueve su propia transferencia pero probablemente es incapaz de iniciar la transferencia del cromosoma bacteriano.

Cuando el factor F se integra al cromosoma bacteriano, mediante los procesos de recombinación, da origen a una célula Hfr, la cual es capaz de una transferencia polarizada de alta frecuencia de marcadores cromosómicos. Sin embargo, el factor sexual no se transmite excepto en muy raras ocasiones debido a que entra como un marcador cromosómico enlazado a los genes que penetran en la célula receptora en el último lugar. (11)

La integración del factor F al cromosoma bacteriano puede realizarse en varios sitios del genoma originándose así diferentes cepas de Hfr, por ejemplo, la cepa Hfr λ comprende a una población homogénea de células donadoras que transfieren primeramente los marcadores thr, ara, leu,.. en el sentido de las manecillas del reloj, mientras que la cepa Hfr C transmite tempranamente los marcadores purE, tax, lac,.. en el sentido contrario a las manecillas del reloj.

La transición del estado F^+ al de Hfr por la integración del factor sexual al cromosoma circular de la bacteria tiene como consecuencia la formación de un cromosoma más grande (3) y el factor sexual se resuelve entonces en una estructura lineal, uno de cuyos extremos es la cola y el otro se convierte en el origen de la transferencia del cromosoma.

El proceso inverso ó sea, la transición del estado Hfr al de F^+ se debe a la escisión de factor sexual del cromosoma bacteriano, de tal manera, que vuelve a quedar libre en el citoplasma, pero puede ocurrir que durante su liberación el factor sexual se lleve un pedazo del cromosoma bacteriano de uno ú otro de los extremos con los cuales estaba unido, en el resultado de un factor sexual que transporta un segmento de cromosoma bacteriano y al cual se le ha denominado factor sexual sustituido y a la bacteria que lo transporta como F' .

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

a) Cepas Bacterianas.- Cepas de E. coli K-12 usadas para la construcción de la cepa polilisogénica.

T A B L A No. 1

Cepa	Sexo	Características Genéticas	Uso ⁺	Derivación	Fuente
JM 1	Hfr	protótrofa	Cepa receptora de Mucts y 1era. con jugación.	AB 259	A.Taylor
JM33	Hfr	cys B ⁻	Verificar 1er. Mu-1 en triptofano.	AB 259	A.Taylor
JM39	Hfr	protótrofa P1 ⁺	Obtención del fago P1.	JM1 inf. e P1 kt	este laboratorio
JM42	Hfr	proC ⁻ met ⁻ Sm ^S	Checar JM222 y 3a. Conjugación.	AB2503	R.Curtis
JM50	Hfr	ara ⁻	Checar JM 901	JM1 inf. selec ara ⁻	este laboratorio
JM90	F ⁻	thr ⁻ ara ⁻ leu ⁻ proA ⁻ lac ⁻ pyrE ⁻ gal ⁻ his ⁻ xyl ⁻ mtl ⁻ argE ⁻ Sm ^R	Checar JM 913	AB 2503	A.Taylor
JM146	Hfr	thy ⁻ (Mu-1 ⁺)	Obtención del fago Mu-1	JM1 inf. e Mu-1.	este laboratorio
JM150	Hfr	protótrofa, Mucts ⁺	Obtención del fago Mu cts.	JM1 inf. e Mu cts.	este laboratorio
JM200	F ⁻	thr ⁻ ara ⁻ leu ⁻ proA ⁻ lac ⁻ thyA ⁻ gal ⁻ his ⁻ xyl ⁻ mtl ⁻ pyrE ⁻ argE ⁻	Iniciación del -- proyecto. 1era. - receptora.	JM 90	este laboratorio
JM222	Hfr	lac ⁻ (Mucts ⁺) Sm ^S	4a. Conjugación	JM1 inf. e Mucts selec Mac Conkey.	este laboratorio
JM901	Hfr	thr ⁻ (Mucts ⁺) Sm ^S	2a. Conjugación	JM1 inf. e Mucts selec ampicilina.	este laboratorio
JM913	Hfr	metF ⁻ ó B ⁻ (Mucts ⁺) Sm ^S	1era. Transducción	JM1 inf. e Mucts selec ampicilina.	este laboratorio

+ Ver obtención de cepa polilisogénica en resultados

⊗ Todas las características genéticas fueron checadas antes de cada experimento.

! Nomenclatura de acuerdo a Taylor A. (29)

thr⁻ = auxótrofa de treonina

leu⁻ = auxótrofa de leucina

pyrE⁻ = primidina E, auxótrofa de uracilo

pro⁻ = auxótrofa de prolina

met⁻ = auxótrofa de metionina

his⁻ = auxótrofa de histidina

trp⁻ = auxótrofa de triptofano

arg⁻ = auxótrofa de arginina

thy⁻ = auxótrofa de timina

cys⁻ = auxótrofa de cisteína

lac⁻ = lactosa: incapacidad para la utilización de L-lactosa

gal⁻ = galactosa: incapacidad para la utilización de L-galactosa

ara⁻ = arabinosa: incapacidad para la utilización de L-arabinosa

xyl⁻ = xilosa: incapacidad para la utilización de L-xilosa

mtl⁻ = manitol: incapacidad para la utilización de manitol

Sm^S = sensible a estreptomina

Sm^R = resistente a estreptomina

Hfr = alta frecuencia de recombinación

metF⁻ (Mu-1⁺) = metionina F⁻ producida por la integración del --
profago Mu-1 en este locus genético.

b) Cepas de bacteriófagos.-

Bacteriófago Mu-1.-Fué obtenido por crecimiento de la cepa JM 146 lisogénica para este fago. Los fagos liberados por inducción espontánea se propagaron posteriormente sobre la JM 1 obteniéndose crecimiento confluyente con un título de $5-8 \times 10^9$ fagos/ml.

Bacteriófago P 1 kt.- Fago transducente, se obtuvo por crecimiento de la cepa JM 39 ($P1^+$) y posteriormente se propagó sobre la cepa JM1, obteniéndose crecimiento confluyente con un título de $5-8 \times 10^9$ fagos/ml.

Bacteriófago Mu cts.- Fué obtenido por crecimiento de la cepa JM 150 lisogénica para este fago. Los fagos liberados por inducción espontánea fueron plateados sobre la JM 1 que es sensible al fago, obteniéndose un título de $5-8 \times 10^9$ fagos/ml.

c) Medios de Cultivo.-

1.-Medio completo.(CaldoLuria).- Usado para el crecimiento de las bacterias, contiene por litro de agua desionizada: triptona (bacto) 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g, timina 30 mg. Se ajusta pH a 7 con NaOH. Se esteriliza en autoclave 20' a 250 °F y 22 lb/in² de presión. El caldo se solidifica con agar al 1% ó 2% dependiendo del uso a que sea destinado.

2.-Medio Mínimo.- Medio de cultivo que contiene por litro de agua desionizada:

12.7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, 5.3g de KH_2PO_4 , 2g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2ml solución de MgSO_4 al 10%, 1ml solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ al 1%, 1ml solución de FeSO_4 al 0.05%, 1 ml solución de azúcar (glucosa) al 20% y 0.1ml solución de B_1 (tiamina) a una concentración

b) Cepas de bacteriófagos.-

Bacteriófago Mu-1.-Fué obtenido por crecimiento de la cepa JM 146 lisogénica para este fago. Los fagos liberados por inducción espontánea se propagaron posteriormente sobre la JM 1 obteniéndose crecimiento confluyente con un título de $5-8 \times 10^9$ fagos/ml.

Bacteriófago P 1 kt.- Fago transductante, se obtuvo por crecimiento de la cepa JM 39 ($P1^+$) y posteriormente se propagó sobre la cepa JM1, obteniéndose crecimiento confluyente con un título de $5-8 \times 10^9$ fagos/ml.

Bacteriófago Mu cts.- Fué obtenido por crecimiento de la cepa JM 150 lisogénica para este fago. Los fagos liberados por inducción espontánea fueron plateados sobre la JM 1 que es sensible al fago, obteniéndose un título de $5-8 \times 10^9$ ---- fagos/ml.

c) Medios de Cultivo.-

1.-Medio completo.(CaldoLuria).- Usado para el crecimiento de las bacterias, contiene por litro de agua desionizada: triptona (bacto) 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g, tiamina 30 mg. Se ajusta pH a 7 con NaOH. Se esteriliza en autoclave 20' a 250°F y 22 lb/in² de presión. El caldo se solidifica con agar al 1% ó 2% dependiendo del uso a que sea destinado.

2.-Medio Mínimo.- Medio de cultivo que contiene por litro de agua desionizada:

12.7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5.3g de KH_2PO_4 , 2g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2ml solución de MgSO_4 al 10%, 1ml solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ al 1%, 1ml solución de FeSO_4 al 0.05%, 1 ml solución de azúcar (glucosa) al 20% y 0.1ml solución de B_1 (tiamina) a una concentración

de 0.17 ug/ml de medio. Se esteriliza en la autoclave 20 min a 250°F y 22lb/in² de presión. Al salir se añade el requerimiento adecuado para cada cepa.

3.- Medio de Azúcares.--(Para identificación de cepas fermentadoras de azúcares): a 500 ml de agua desionizada -- agregar 20 gr de Mac Conkey agar base deshidratado, adicionar a ésta mezcla base 5 g. frl carbohidrato deseado.

Algunos azúcares se esterilizan en la autoclave y otros por filtración.

M E T O D O S

a) Mutagénesis por el bacteriófago Mu cts y selección por Ampicilina.

- 1.- Se toma 0.1ml de un cultivo fresco de la cepa bacteriana que se desea mutar (aproximadamente 10^8 células/ml) y se extiende sobre la superficie de una caja de L-agar al 1% mas Mg^{++} .
- 2.- Con una pipeta de 20 microlitros, se añade una gota del fago Mu cts (Concentración $1-5 \times 10^9$ fagos/ml) sobre las bacterias previamente extendidas.
- 3.- Las cajas se incuban durante 8-10 horas a $32^{\circ}C$
- 4.- Se toman las sobrevivientes que crecieron en el halo de la lisis y se resuspenden en caldo luria si se desea seleccionar varios tipos de mutantes. Si se desea únicamente una mutante específica se resuspenden las sobrevivientes en MM/2 más el nutriente que requiere la mutante que se desea seleccionar.
- 5.- Las sobrevivientes se crecen durante 4-6 horas a $32^{\circ}C$ - con agitación ó hasta que el cultivo se vea turbio. (10^7 células/ml)
- 6.- Centrifugar y lavar dos veces con MM/2. Se resuspende - en MM/2 SIN EL NUTRIENTE que requiere la mutante.
- 7.- Se pone en ayuno del nutriente durante 2-3 horas a $32^{\circ}C$ con agitación.
- 8.- Se añade ampicilina a una concentración de 20 $\mu g/ml$, esterilizada por filtración.
- 9.- Se dejan las células en contacto con la ampicilina durante aproximadamente 2 horas a $32^{\circ}C$ con agitación ó hasta que

sea visible la lisis.

- 10.-Centrifugar y lavar dos veces con MM/2 y resuspender en MM/2 MAS LOS REQUERIMIENTOS de la mutante.
 - 11.-Se crecen a 32°C con agitación hasta 10^8 células/ml no excederse de 2×10^8 células/ml.
 - 12.-Se repite el ciclo de ayuno-ampicilina. (pasos 6-10)
 - 13.-Se diluye 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y se platea ó se hacen espirales en cajas de L-agar al 2%; se incuban a 32°C.
 - 14.-Se hacen parches de las colonias aisladas y se caracteriza la mutante.
- b) Propagación del fago P1 para experimentos de Transducción
- 1) Se crece la cepa donadora hasta una concentración de 10^9 células/ml.
 - 2) Diluir la suspensión del fago hasta 5×10^6 fagos/ml con caldo luria.
 - 3) Fundir 4-5 tubos de L-agar 0.5%, a cada tubo agregar 0.04 ml de CaCl_2 0.25M.
 - 4) Trabajando con un tubo cada vez, agregar 0.1ml del cultivo de la cepa donadora y 0.1 ml de la dilución del fago.
 - 5) Platear sobre 4-5 cajas de L-agar al 1% más Ca^{++} .
 - 6) Incubar las cjas durante 7-9 horas a 37°C con la tapa hacia arriba.
 - 7) Después de la incubación se agregan 2.5ml de caldo luria y se incuban durante dos horas más.
 - 8) Tomar el líquido de las cajas y centrifugar en tubos que contengan 0.5ml de cloroformo.

- 9) El sobrenadante se pasa a otro tubo y agregar 1ml de cloroformo y guardar en frío previa titulación del fago, usando la JM 1 como cepa indicadora.

c) Procedimiento para experimentos de transducción.

- 1) Se crecen 5ml de las células receptoras en caldo Luria -- hasta una concentración aproximada de $3-5 \times 10^9$ células/ml
- 2) Centrifugar el cultivo a 2,500 rpm durante 10 min y resuspender las células en 1ml de solución salina 0.85%. Añadir 0.1ml de CaCl_2 0.25M.
- 3) Diluir el lisado de P1 con caldo Luria, 1:5 previamente crecidos sobre la cepa donadora, y aerear la dilución -- suavemente durante 15 min. a 37°C en un baño rotatorio.
- 4) Mezclar 0.5ml de la suspensión de células con 4.5ml de P1 aereado y dejar la mezcla, sin agitación, a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 5) Transcurridos los 30 minutos, centrifugar la suspensión a 2,500 rpm durante 10 min y resuspender las células en 1ml de solución salina, 0.85%.
- 6) Diluir 10^{-1} , 10^{-2} y platear en medio selectivo.

Control: Platear 0.1ml de la célula receptora en medio selectivo.

d) Procedimiento para experimentos de Coniugación.

- 1) Crece la célula donadora (♂) y receptora (♀) en caldo Luria durante toda la noche a 32°C .
- 2) Las células donadoras se crecen en 10 ml de caldo Luria -- colocando 0.5ml del cultivo de la cepa, y las células receptoras colocando 1 ml de ellas en 10 ml de medio completo, poner a 32°C con agitación.
- 3) Crece la célula donadora a 35 UK (Unidades Klett Sommer

sen) y la receptora a 4: UK.

- 4) Mezclar 0.5ml de la donadora con 4.5ml de la receptora.
- 5) Incubar a 32°C sin agitación, durante el tiempo designado
- 6) Se interrumpe la conjugación por agitación durante 1 mín. en un vibrador.
- 7) Centrifugar a 2,500 rpm durante 10 minutos y resuspender en 1 ml de solución salina.
- 8) Platear 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , en medios selectivos.
- 9) Incubar a 32°C durante 2-3 días.

Control: Platear 0.1 ml de la célula receptora en medio selectivo.

e) Procedimiento para medir la frecuencia de Inducción Espontánea.

- 1) Se crece la cepa lisogénica hasta una concentración aproximada de 5×10^9 células/ml.
- 2) Se diluye el cultivo 1:10 con caldo Luria y se incuba a 32°C con agitación hasta lectura de 60 UK.
- 3) Se toman muestras de 0.1ml a diferentes UK y a diferentes temperaturas y se colocan en tubos que contienen 0.2ml de cloroformo preincubados en hielo.
- 4) Las muestras se centrifugan a 3,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se titula sobre una cepa sensible al fago (JM 1).

RESULTADOS

Como anteriormente se ha mencionado el DNA del fago Mu-1 comprende un gene llamado C_1 que codifica para la molécula de represor cuya función es la de regular la expresión génica, - impidiendo la transcripción de parte del genoma del fago.

El fago Mu cts codifica también para una molécula de re-
presor pero ésta es termolábil, es decir es una molécula que
a temperaturas mayores de 42°C se desnaturaliza y por ésta -
razón ya no es capaz de regular la expresión del genoma del -
fago. Al perderse la regulación, por haberse inactivado el -
represor, el pñgfago se escinde causando posteriormente la -
lisis de células lisogénicas para éste fago mutante Mu cts.

Cuando un cultivo de células lisogénicas para el fago -
Mu-1 se calienta a 42°C , no hay lisis de las células ni hay
aumento en la inducción espontánea del fago ya que el repre-
sor codificado por éste a diferencia del Mu cts, no es ter--
molábil. Fig. No.10

A la fecha no se tenían células lisogénicas para ambos
fagos y parecía interesante construir ésta célula y pregun--
tarse si ocurriría lisis del cultivo al aumentar la tempera-
tura a 42°C . Existían dos posibilidades teóricas; la primera
que el cultivo se lisara por el hecho de que al inactivarse -
el represor codificado por Mu cts, éste se indujera lisando -
a la célula.

La segunda consistía en que la célula no se lisara y és-
to debido al hecho de que aún que se inactivara el represor -

termolábil, la presencia de moléculas de represor codificadas por el fago Mu-1, que son termoestables impedirían la escisión ó por lo menos la multiplicación vegetativa del fago.

Además si fuera cierta la segunda posibilidad cabría preguntarse si el hecho de ir aumentando el número de profagos Mu cts en relación al profago Mu-1, llegaría en algún momento a lisar a la célula.

Esto se presumía del hecho de que el número de moléculas de represor citoplasmáticas reportadas para el bacteriófago λ es aproximadamente de 10 y entonces al ir aumentando el número de profagos Mu cts en relación al silvestre llegaría un momento en que se saturaran las moléculas codificadas por el Mu-1 y nó pudieran impedir la expresión de uno de los profagos Mu cts.

Nó necesariamente quiere decir que para haber lisis tendrían que ser 10 profagos Mu cts y uno Mu-1 ya que hay que pensar en que ambos tipos de represores están en equilibrio y es posible que no se necesitaran tantos profagos Mu cts para que alguno no pudiera ser inactivado.

Otra de las cosas interesantes que podrían resultar de este fenómeno es el hecho de encontrar revertantes del fago Mu-1 yá que a la fecha no se han reportado. La idea se basa en el mismo principio; es decir si llega un momento en el cual se tengan un cierto número de profagos Mu cts y un solo profago Mu-1 y el cultivo se calienta a 42°C es posible que alguno de los profagos se escinda y al hacerlo lo haga en la misma forma que se incertó y por ello deje de causar la mutación que está originalmente causando.

Además hay que asumir que aún cuando el profago se escinda, no entre al ciclo vegetativo por el hecho de que alguna molécula de represor termoestable lo reprima antes.

A) Construcción de cepas donadoras de Mu cts.

En función de los marcadores que tiene la cepa receptora JM 200 se construyeron cepas donadoras del profago Mu cts en donde el profago estuviera insertado en marcadores cotransducibles con alguno de los marcadores de la JM 200, siempre y cuando la distancia entre éstos marcadores no excediera de 1 minuto yá que como se mencionó en la introducción, la presencia del genoma del fago Mu cts significa otro minuto de cromosoma bacteriano sumando con ésto dos minutos que es el límite de material genético que puede cotransducir el bacteriófago P1.

En este sentido se construyó la cepa JM 913 met F⁻ ó B⁻ (Mu cts⁺) yá que el marcador metF⁻ ó B⁻ está situado a medio minuto del marcador argE en el mapa cromosómico de *E. coli*.

Para verificar que la mutación producida por el bacteriófago Mu cts mapeaba en el locus Met F⁻ ó B⁻, se creció el bacteriófago P1 sobre la cepa JM 913 y se infectó la cepa JM 90 seleccionando para ArgE⁺. Entre las transductantes argE⁺ fué posible demostrar la existencia de cotransductantes met⁻ (Mu cts⁺) lo que significa que la mutación producida por el bacteriófago Mu cts en la cepa JM 913 mapea a medio minuto de argE y ésto corresponde al locus MetF⁻ ó MetB⁻.

En la misma forma se construyó la cepa JM 901 thr⁻ (Mu cts⁺) Se creció el bacteriófago P1 sobre ésta cepa thr⁻ (Mu cts⁺) y se infectó la cepa JM 50 ara⁻; se seleccionó para Ara⁺ y entre éstas transductantes se obtuvieron cotransductantes thr⁻ (Mu cts⁺) lo que implica que el Mu cts está ligado a la mutación thr⁻.

B) Construcción de la cepa polilisogénica para el profago --
Mu cts y monolisogénica para el profago Mu-1.

I Planteamiento teórico

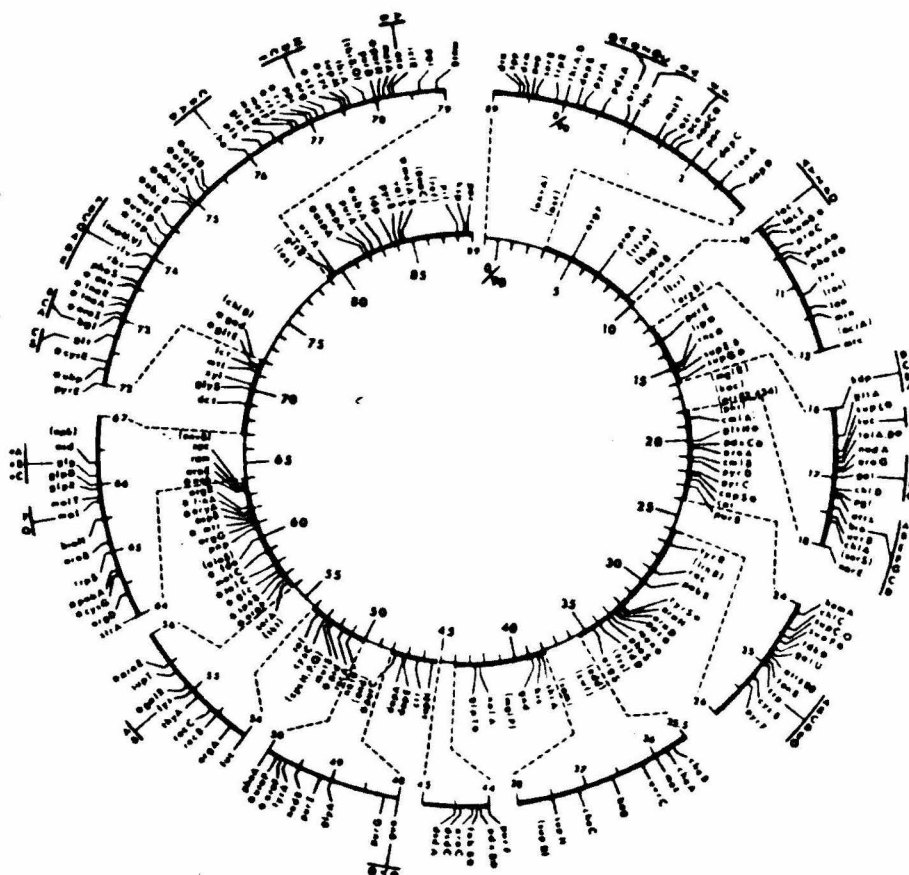
Una de las primeras ideas que hay que tener en mente -- para construir una cepa polilisogénica es la inmunidad específica, es decir, no es posible volver a infectar una célula lisogénica para un determinado bacteriófago con ése mismo -- virus bacteriano en que la bacteria es inmune a posteriores infecciones.

De acuerdo con ésto es necesario pensar en otros caminos para lograr introducir más genomas fágicos en el cromosoma bacteriano. Se llegó a la conclusión que experimentos -- de conjugación y de transducción serían los más adecuados para llevar a cabo nuestro objetivo. Los primeros se llevarían a cabo usando una bacteria donadora (Hfr), que transmitiese profagos de Mu cts a una bacteria lisogénica para Mu cts.

Los segundos serían experimentos de cotransducción en -- los cuales, como previamente se mencionó, se seleccionará -- para un marcador y se buscará entre las bacterias que hayan adquirido ésta característica alguna que además haya también adquirido del donador otra característica fenotípica y genotípica, debido a la presencia del profago Mu cts integrado.

Una vez decidido lo anterior nos encaminamos a estudiar el mapa genético del cromosoma de E. coli K-12.

Fig. No. 8 Mapa del Cromosoma de E. coli



Si uno de los primeros pasos en la construcción de la cepa polilisogénica fuese el colocar un profago, por ejemplo en el gene *pyrC* esto provocaría el hecho de que no se podría usar ya ninguno de los genes de la vía metabólica para la biosíntesis de pirimidinas para insertar otro profago, ya que la forma en que se detecta una mutación en alguno de estos genes es aislando una célula auxótrofa de uracilo ya que ninguno de los productos intermediarios es capaz de penetrar a la célula y de acuerdo con esto no se podría saber si la necesidad por este metabolito se debe a la primera mutación, a la segunda ó a ambas.

Ejemplos como el anterior, lo podemos encontrar en varias vías metabólicas y por tanto esto reduce el número de genes cotransducibles que no presentan problemas.

El siguiente paso, fué el seleccionar una cepa que tuviera en su cromosoma una serie de mutaciones en genes que fuesen cotransducibles con genes que tuvieran el profago μ insertados en esos genes. Es muy importante, para nuestros fines, que la distancia entre éstos genes cotransductantes no excediera de un minuto ya que a esto hay que añadirle un minuto del DNA del profago de μ , lo que implica dos minutos de material genético ó sea 58 millones de daltones, peso molecular en DNA que es aproximadamente el máximo que puede cotransducir el bacteriófago P1.

Se decidió que la cepa con la que se iniciaría la construcción de la polilisogénica, sería la JM 200 y la razón de esto, es que posee características adecuadas para ello.

La JM 200 thr⁻ara⁻leu⁻proA⁻lac⁻gal⁻his⁻xyl⁻mtl⁻pyrE⁻argE⁻ tiene una serie de marcadores cotransducibles con los siguientes:

89.6	0	0.3'	0.35'	0.5'	0.9'	1'		
serB	<u>thr</u>	dapB	pyrA	pdxA	ara	leu		
	0	0.3'	0.55'	0.5'	0.9'	1'	1.5'	
	thr	dapB	pyrA	pdxA	<u>ara</u>	leu	azi	
	0	0.3'	0.35'	0.5'	0.9'	1'	1.5'	2'
	thr	dapB	pyrA	pdxA	ara	<u>leu</u>	azi	pan
	7'							
	<u>proA</u>							
	9.3'	10'	10.4'					
	proB	<u>lac</u>	porC					
	16.8'	16.9'	17'	17.4'				
	nadA	aroG	<u>gal</u>	bio				
		39.5'	39.2'					
		<u>his</u>	shiA					
		70.2'	71.1'					
		<u>xyl</u>	mtl					
		70.2'	71.1'	72'				
		<u>xyl</u>	<u>mtl</u>	pyrE				
			71.1'	72'	72.3'			
			mtl	<u>pyrE</u>	cysE			
			76.6'	76.8'	77.2'	78		
			metB	metF	<u>argE</u>	purD		

Gracias a experimentos de cotransducción, es posible - conocer si el profago Mu cts se encuentra insertado en el -- gene que se presume.

La forma en que ésto se demuestra se describe a continua- ción y así se demuestra la existencia del profago Mu-1 en el operón de triptofano en la cepa JM 201.

Se mutagenizó la cepa JM 200 con el fago Mu-1 y se selec- cionaron células auxótrofas de triptofano producidas por la - inserción del profago en alguno de los genes del operón del triptofano; se pensó en este marcador ya que la mayor parte - de las auxótrofas de triptofano mapean en el minuto 25 del - mapa genético de E. coli.

Como siguiente paso se demostrará que el profago es el causante de la mutación es decir está integrado en el operón. Para ello, se crecerá el bacteriófago transductante P1 en la cepa mutagenizada y se usará una cepa que sea $cysB^-$ (JM 33) como receptor en una cotransducción.

Seleccionar transductantes Cys^+ y buscar entre las célu- las transductantes alguna que sea auxótrofa de triptofano; - ésta célula necesariamente tiene que ser $Mu-1^+$ para poder -- concluir que la mutación en alguno de los genes del operón - del triptofano está producida por la inserción del profago.
JM 200 $thr^- ara^- leu^- proA^- lac^- gal^- his^- thyA^- xyl^- mtl^- pyrE^- argE^-$.

↓
Mutagénesis con el fago; seleccionar $Trp^- (Mu-1^+)$.

JM 201 $thr^- ara^- leu^- proA^- lac^- gal^- trp^- (Mu-1^+) his^- thyA^- xyl^-$
 $mtl^- pyrE^- argE^- Sm^r$

El siguiente paso es construir la cepa JM 920 a partir de la JM 201. Para ello, se efectuó una conjugación usando la cepa JM 1 (protótrofa) como donador. Se usará la cepa JM 201 como receptora y se plateará sobre un medio que contenga estreptomycinina para matar a las células Hfr.

Se detendrá la conjugación a los 15 minutos y se seleccionará para Thr^+ buscando entre estas recombinantes estreptomycinina resistente alguno que reúna los siguientes marcadores: $\text{thr}^+ \text{ara}^- \text{leu}^- \text{proA}^- \text{lac}^- \text{gal}^- \text{trp}^- (\text{Mu}-1^+) \text{his}^- \text{thyA}^- \text{xyl}^- \text{mtl}^- \text{pyrE}^- \text{argE}^- \text{Sm}^r$.

JM 201 $\text{thr}^- \text{ara}^- \text{leu}^- \text{proA}^- \text{lac}^- \text{gal}^- \text{trp}^- (\text{Mu}-1^+) \text{his}^- \text{thyA}^- \text{xyl}^- \text{mtl}^- \text{pyrE}^- \text{argE}^- \text{Sm}^r$

Conjugación JM 1 Hfr Sm^s X JM 201. Seleccionar para Thr^+ y buscar recombinantes estreptomycinina resistente

JM 920 $\text{thr}^+ \text{ara}^- \text{leu}^- \text{proA}^- \text{lac}^- \text{gal}^- \text{trp}^- (\text{Mu}-1^+) \text{his}^- \text{thyA}^- \text{xyl}^- \text{mtl}^- \text{pyrE}^- \text{argE}^- \text{Sm}^r$.

La razón de seleccionar en este paso para Thr^+ es que el siguiente paso será seleccionar células Leu^+ y buscar células $\text{thr}^- (\text{Mu cts}^+)$ y si la cepa fué thr^- no se podrían diferenciar las células $\text{thr}^- (\text{Mu cts}^+)$ de las thr^- originales.

Entonces buscando entre las células recombinantes alguna que sea auxótrofa de treonina ésta célula necesariamente tiene que ser Mu cts^+ .

JM 920 thr⁺ ara⁻ leu⁻ proA⁻ lac⁻ gal⁻ trp⁻ (Mu-1⁺) his⁻ thyA⁻
xyl⁻ mtl⁻ pyrE⁻ argE⁻ Sm^r.

Conjugación JM 901 thr⁻ (Mu cts⁺) Sm^s X JM 920. Seleccionar para Leu⁺ y buscar recombinantes thr⁻ Sm^r.

JM 921 thr⁻ (Mu cts⁺) ara⁻ leu⁺ proA⁻ lac⁻ gal⁻ trp⁻ (Mu-1⁺)
his⁻ thyA⁻ xyl⁻ mtl⁻ pyrE⁻ argE⁻ Sm^r.

En este paso se inserta el primer bacteriófago Mu cts.

El siguiente paso es construir la cepa JM 922 a partir de la JM 921. Para ello, se efectuó una conjugación usando - la cepa JM 42 proC⁻ met⁻ lac⁺ Sm^s como donador. Se usará la cepa JM 921 como receptora y se plateará sobre un medio que contenga estreptomicina para matar a las células Hfr.

Se detendrá la conjugación a los 20' y se seleccionará para Lac⁺ y entre los recombinantes buscaremos alguno que reúna los siguientes marcadores:

thr⁻ (Mu cts⁺) ara⁻ leu⁺ proA⁻ lac⁺ gal⁻ trp⁻ (Mu-1⁺) his⁻ thyA⁻
xyl⁻ mtl⁻ pyrE⁻ argE⁻ Sm^r.

La razón de seleccionar en este paso Lac⁺ es que el siguiente paso será seleccionar Lac⁻ (Mu cts⁺).

JM 921 thr⁻ (Mu cts⁺) ara⁻ leu⁺ proA⁻ lac⁻ gal⁻ trp⁻ (Mu-1⁺) his⁻
thyA⁻ xyl⁻ mtl⁻ pyrE⁻ argE⁻ Sm^r.

Conjugación JM 42 proC⁻ met⁻ lac⁺ Sm^s X JM 921. Seleccionar para Lac⁺.

JM 922 thr⁻ (Mu cts⁺) ara⁻ leu⁺ proA⁻ lac⁺ gal⁻ trp⁻ (Mu-1⁺)
his⁻ thyA⁻ xyl⁻ mtl⁻ pyrE⁻ argE⁻ Sm^r.

El siguiente paso es construir la cepa JM 923. Para ello se efectuó una conjugación usando la cepa JM 222 lac^- (Mu cts^+) como donador. Se usará la cepa JM 922 como receptora y se plánteará sobre un medio que contenga estreptomycin para matar a las células Hfr. Se detendrá la conjugación a los 20 minutos y se seleccionará para Lac^- en medio indicador Mc. Conkey.

Se insertará el bacteriófago Mu cts en el gene que codifica para lactosa y este será el segundo Mu cts insertado --- además del Mu-1 en triptofano.

JM 922 thr^- (Mu cts^+) ara^- leu^+ proA^- lac^+ gal^- trp^- (Mu-1 $^+$)
 his^- thyA^- xyl^- mtl^- pyrE^- argE^- Sm^r .

Conjugación JM 222 lac^- (Mu cts^+) Sm^s X JM 922. Seleccionar para Lac^- en Mc. Conkey.

JM 923 thr^- (Mu cts^+) ara^- leu^+ proA^- lac^- (Mu cts^+) gal^-
 trp^- (Mu-1 $^+$) his^- thyA^- xyl^- mtl^- pyrE^- argE^- Sm^r .

El siguiente paso es construir la cepa JM 924 3 Mu cts^+ 1 Mu-1 $^+$ a partir de la JM 923. Para ello, se propagará P1 en la cepa JM 913 $\text{metF}^- \text{ó} \text{B}^-$ (Mu cts^+) y se usará este P1 JM 913 para infectar la cepa JM 923 seleccionando para transductantes ArgE^+ y buscando entre ellas alguna cotransductante que fuera met^- que sería metF^- ó B^- (Mu cts^+).

La razón de seleccionar en este paso para ArgE^+ es buscar metF^- ó B^- (Mu cts^+) marcador cotransducible con arginina E, buscando entre las células cotransductantes que sean - auxótrofas de metionina; ésta célula será necesariamente - met^- (Mu cts^+).

JM 923 thr⁻(Mu cts⁺) ara⁺ leu⁺ proA⁻ lac⁻(Mu cts⁺) gal⁻
 trp⁻(Mu -1⁺) his⁻ thyA⁻ xyl⁻ mtl⁻ pyrE⁻ argE⁻ Sm^r.

Cotransducción usando P1 crecido en la JM 913 como do
 nador y usando la JM 923 como cepa receptora. Selec--
 cionar para Arg⁺ y buscar cotransductantes met⁻(Mu cts⁺).

JM 924 thr⁻(Mu cts⁺) ara⁺ leu⁺ proA⁻ lac⁻(Mu cts⁺) gal⁻ trp⁻
 (Mu-1⁺) his⁻ thyA⁻ xyl⁻ mtl⁻ pyrE⁻ argE⁺ met⁻(Mu cts⁺)
 Sm^r.

Una vez construida la cepa polilisogénica se medirán y se com
 pararán los tiempos de duplicación de cada cepa construida.
 Se compararán también las frecuencias de inducción espontánea
 de todas.

Construcción de la cepa polilisogénica para el profago Mu cts y Monolisogénica para el profago Mu-1.

II. Obtención de la célula polilisogénica para el profago Mu cts y Monolisogénica para el profago Mu-1.

El título de fago P1 que se usó en los experimentos de co---transducción oscilaba entre $1-5 \times 10^9$ fagos/ml.

1.- Obtención de la cepa JM 201.

Se mutagenizó la cepa JM 200 con el fago Mu-1 y se seleccionó para mutantes auxótrofos de triptofano por el método de la ampicilina. Se revisaron 2,000 colonias sobrevivientes y dos de ellas fueron trp^- (Mu-1^+).

Para conocer si el profago Mu-1 estaba ligado a la mutación se hizo crecer el P1 en estas dos cepas y usando la cepa JM 33 cysB^- , se seleccionó para CysB^+ y se buscaron células trp^- que deberían ser Mu-1^+ . Las trp^- fueron todas Mu-1^+ en ambos casos.

Se verificaron los demás marcadores y se aisló la cepa JM 201 (Tabla No.2).

2.- Obtención de la JM 920.

Se usó la cepa JM1 como donador en una conjugación donde la hembra era la cepa JM 201. Se seleccionó para Treo^+ y se buscaron recombinantes que fuesen $\text{thr}^+ \text{ara}^- \text{proA}^- \text{lac}^- \text{gal}^- \text{trp}^- (\text{Mu-1}^+) \text{his}^- \text{thyA}^- \text{xyl}^- \text{mtl}^- \text{pyrE}^- \text{argE}^- \text{Sm}^r$, interrumpiendo la conjugación a los 25'. Se aislaron 80 recombinantes treo^+ y 3 de ellas tenían los otros marcadores de la cepa JM 920.

3.- Obtención de la cepa JM 921.

Se usó la cepa JM 901 como donador en una conjugación donde la hembra era la cepa JM 920. Se seleccionó para Leu^+ y se buscaron recombinantes que fuesen thr^- (Mu cts^+) ara^- proA^- lac^- gal^- trp^- (Mu-1^+) his^- thyA^- xyl^- mtl^- pyrE^- -- argE^- Sm^r . Interrumpiendo la conjugación a los 20 minutos.

Se aislaron 160 recombinantes leu^+ de los cuales 13 - fueron thr^- (Mu cts^+).

4.- Obtención de la cepa JM 922.

Se usó la cepa JM 42 como donador en una conjugación - donde la receptora fué la cepa JM 921. Se seleccionó para -- Lac^+ y se buscaron recombinantes que fuesen thr^- (Mu cts^+) - ara^- proA^- gal^- trp^- (Mu-1) his^- thyA^- xyl^- mtl^- pyrE^- argE^- Sm^r .

Se interrumpió la conjugación a los 20 minutos. Se aislaron 15 recombinantes lac^+ que cumplieran con los requisitos.

5.- Obtención de la cepa JM 923.

Se usó la cepa JM 222 como donador en una conjugación donde la receptora fué la cepa JM 922. Se seleccionó para - Lac^- en Mac Conkey y se buscaron recombinantes que fuesen thr^- (Mu cts^+) ara^- proA^- lac^- (Mu cts^+) gal^- trp^- (Mu-1^+) his^- thyA^- xyl^- mtl^- pyrE^- argE^- Sm^r . Interrumpiendo la conjugación a los 20 minutos. Se aislaron 5 recombinantes lac^- ; 2 de ellos con los marcadores deseados.

6.- Obtención de la cepa JM 924.

Se trató la cepa JM 923 con P1 crecido en la cepa JM 913 seleccionando para Arg^+ y buscando células met^- (Mu cts^+) - Se revisaron 400 colonias de las transductantes arg^+ y el 28% fueron met^- . Se verificaron los otros marcadores y se aisló la cepa JM 924 (Tabla 2).

27

Cepas obtenidas durante la construcción de la cepa
Polilisogénica para el profago Mu cts y Mono-
lisogénica para el profago Mu-1.

TABLA No. 2

Cepas Obtenidas	Características Genéticas	Derivación
JM 201	thr ⁻ ara ⁻ leu ⁻ proA ⁻ lac ⁻ gal ⁻ trp ⁻ (Mu-1 ⁺) his ⁻ thyA ⁻ xyl ⁻ mtl ⁻ pyrE ⁻ argE ⁻ Sm ^r .	JM 200
JM 920	thr ⁺ ara ⁻ leu ⁻ proA ⁻ lac ⁻ gal ⁻ trp ⁻ (Mu-1 ⁺) his ⁻ thyA ⁻ xyl ⁻ mtl ⁻ pyrE ⁻ argE ⁻ Sm ^r .	JM 201
JM 921	thr ⁻ (Mu cts ⁺) ara ⁻ leu ⁺ proA ⁻ lac ⁻ gal ⁻ trp ⁻ (Mu-1 ⁺) his ⁻ thyA ⁻ xyl ⁻ mtl ⁻ pyrE ⁻ argE ⁻ Sm ^r .	JM 920
JM 922	thr ⁻ (Mu cts ⁺) ara ⁻ leu ⁺ proA ⁻ lac ⁺ gal ⁻ trp ⁻ (Mu-1 ⁺) his ⁻ thyA ⁻ xyl ⁻ mtl ⁻ pyrE ⁻ argE ⁻ Sm ^r .	JM 921
JM 923	thr ⁻ (Mu cts ⁺) ara ⁻ leu ⁺ proA ⁻ lac ⁻ (Mu cts ⁺) gal ⁻ trp ⁻ (Mu-1 ⁺) his ⁻ thyA ⁻ xyl ⁻ mtl ⁻ pyrE ⁻ argE ⁻ Sm ^r .	JM 922
JM 924	thr ⁻ (Mu cts ⁺) ara ⁺ leu ⁺ proA ⁻ lac ⁻ (Mu cts ⁺) gal ⁻ trp ⁻ (Mu-1 ⁺) his ⁻ thyA ⁻ xyl ⁻ mtl ⁻ pyrE ⁻ argE ⁺ met ⁻ (Mu cts ⁺) Sm ^r	JM 923

Curvas de Crecimiento

Se hicieron curvas de crecimiento de las cepas JM 222, JM 920, JM 921, JM 923 y JM 924 a diferentes temperaturas - Los resultados pueden observarse en las figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16.

Análisis de Inducción Espontánea y de Inducción por calor.

Se hicieron estudios de las unidades formadoras de placas de las cepas antes mencionadas. Como puede observarse en la - Figura No. 17 el patrón de la inducción espontánea es similar en todas éstas células cuando la temperatura a la que se hace el ensayo es 32°C. Sin embargo cuando se modifica la temperatura a 42.5°C tal y como puede observarse en la figura No. 18 el número de partículas formadas varía y es proporcional al - número de profagos mutados de la célula.

Análisis de posibles Revertantes de mutaciones producidas por el genoma del fago Mu-1 ó Mu cts.

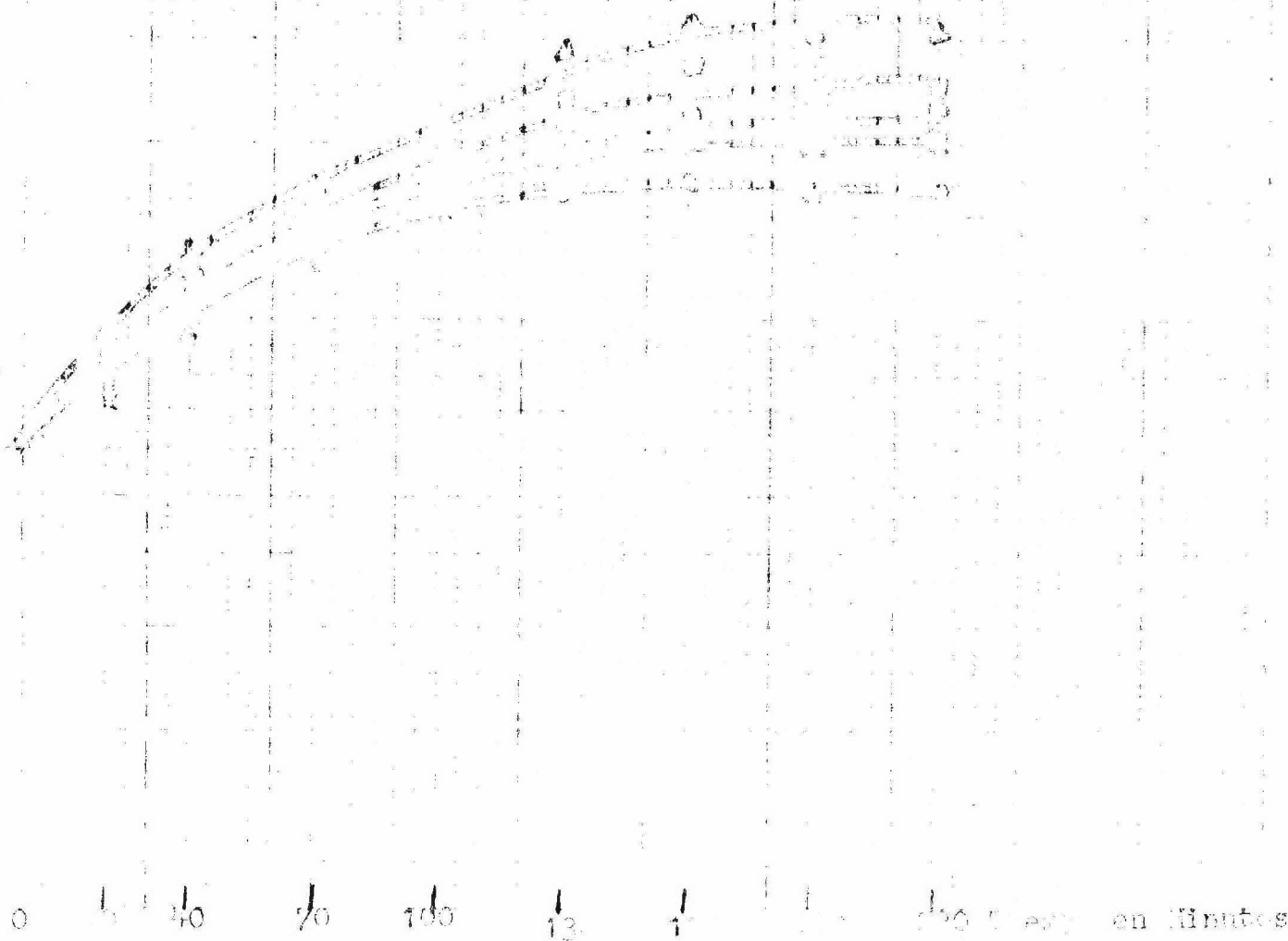
De todos los experimentos de las figuras 10 a 16 se aislaron sobrevivientes a los efectos de inducción por calor y - en ninguno de éstos sobrevivientes se pudo observar reversión alguna.

se elevan las células hasta 60 UK a 32°C y desde este momento se empiezan a tomar lecturas considerando el tiempo cero a 60 UK manteniendo la temperatura a 32°C.

Muets: Mu-1

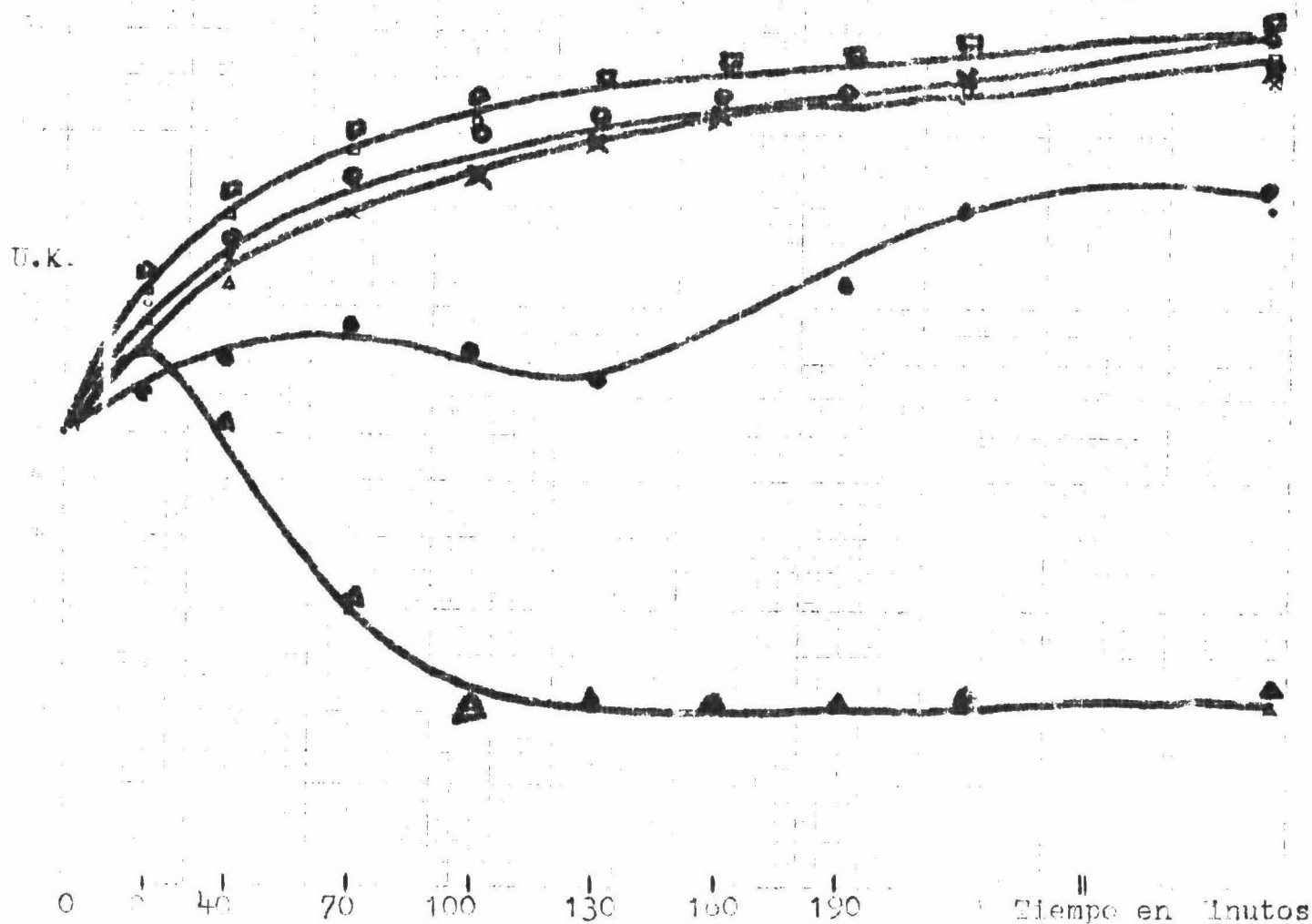
JH 222	△	1	0
JH 920	⊙	0	1
JH 921	⊙	1	1
JH 923	⊙	2	1
JH 924	⊙	3	1

UK



Curva de crecimiento 32°C hasta 60 UK luego se cambia la temperatura a 41.5°C

JM 222	▲	Mu	cts	Mu-1
JM 920	◻	0	1	
JM 921	●	1	1	
JM 923	✕	2	1	
JM 924	●	3	1	



RESULTADOS

FIGURA No. 12

Idem figura 11 pero Cuentas Viabiles Tiempo
en vez de U.L. vs T

Muets : Mu-1

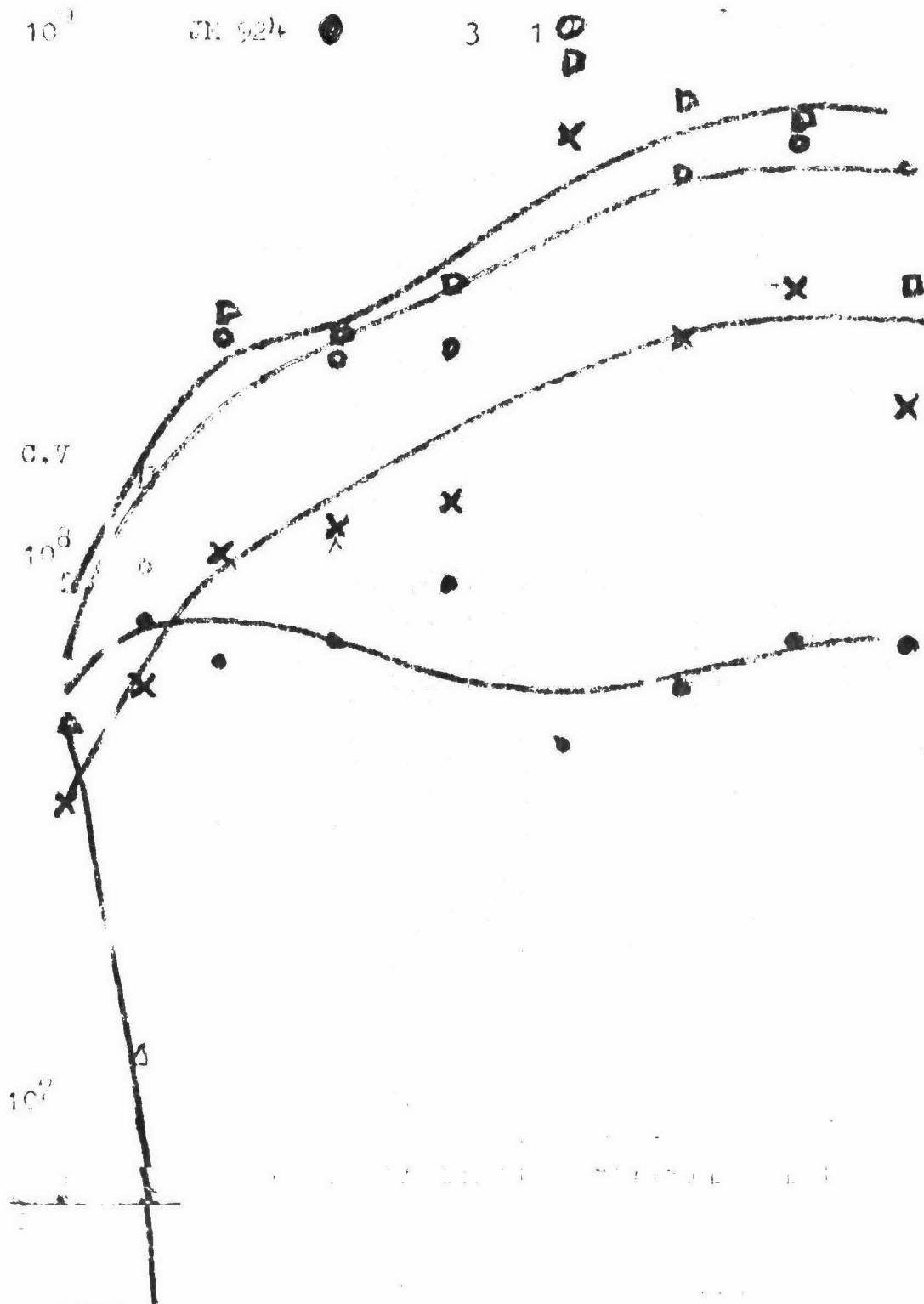
JM 222	△	1	0
JM 920	□	0	1
JM 921	○	1	1
JM 923	×	2	1
JM 924	●	3	1

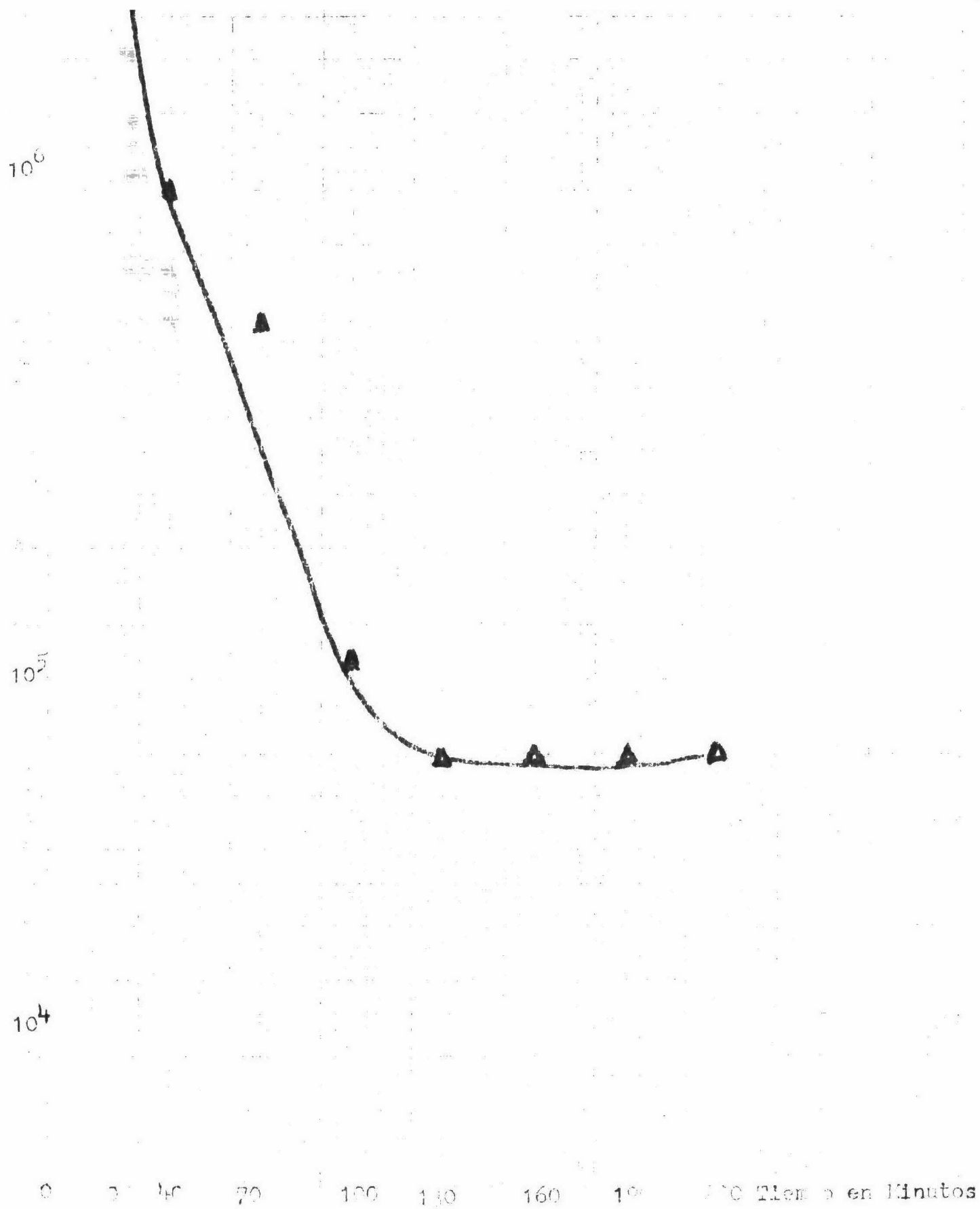
10^9

C.V

10^8

10^7





RESULTADOS

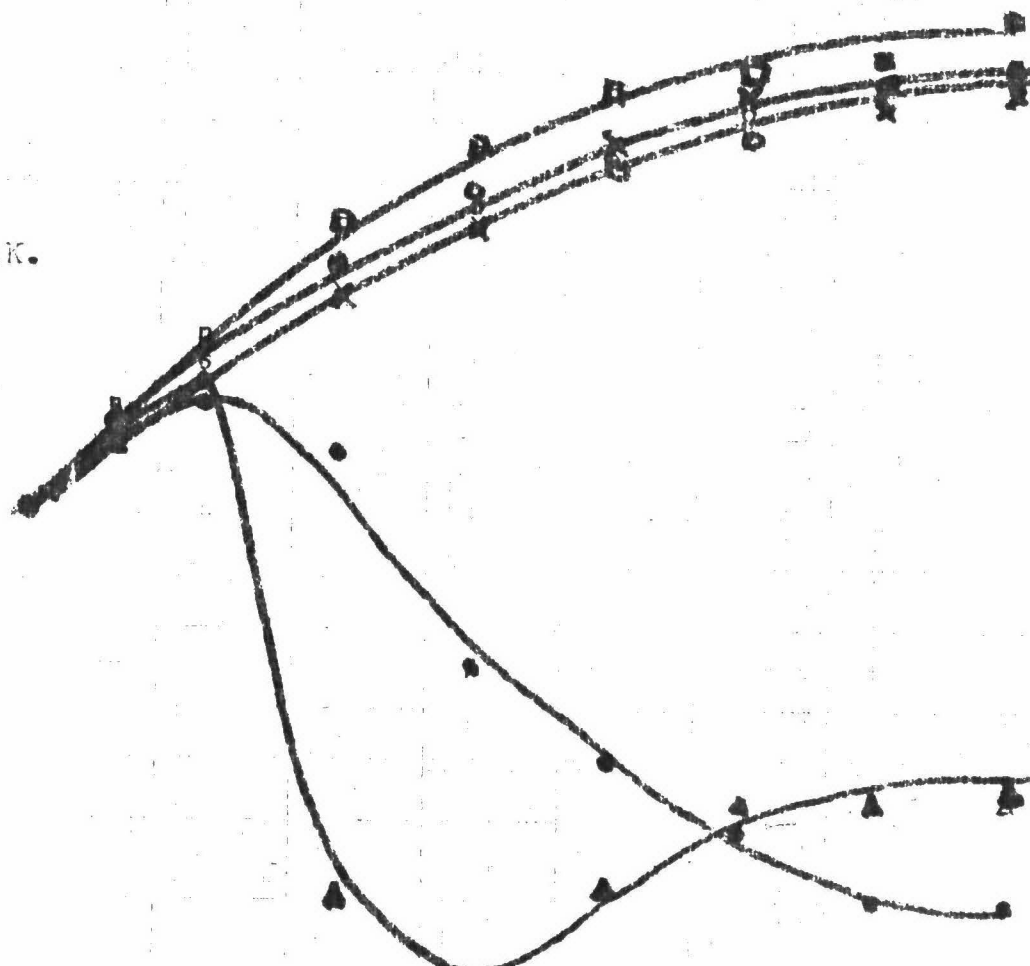
FIGURA No. 13

Curva de crecimiento a 32°C hasta 60 UK y luego se cambia la temperatura a 42°C

Mu cts: Mu-1

JM 222	▲	1	0
JM 920	◻	0	1
JM 921	○	1	1
JM 923	×	2	1
JM 924	●	3	1

U.K.

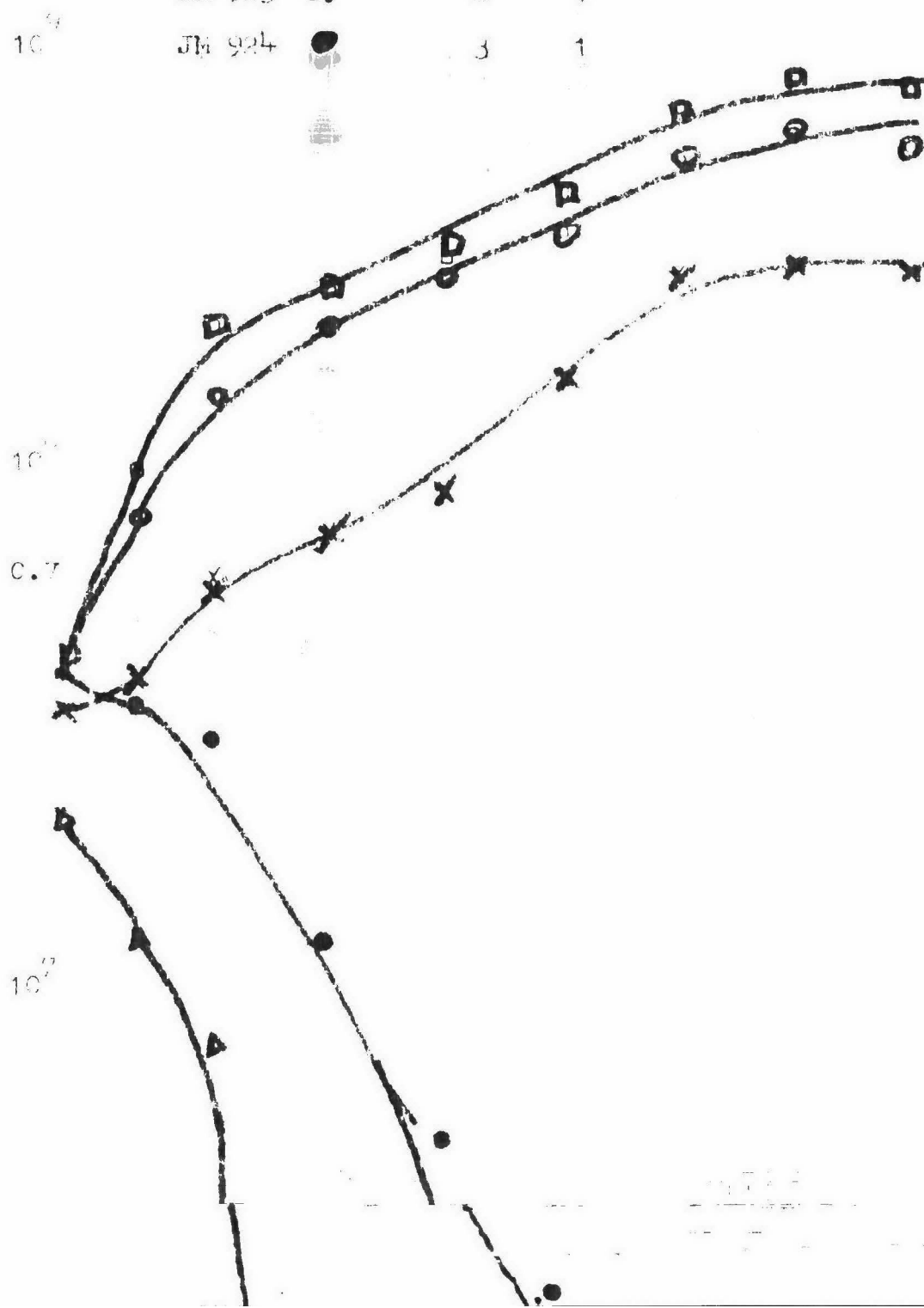


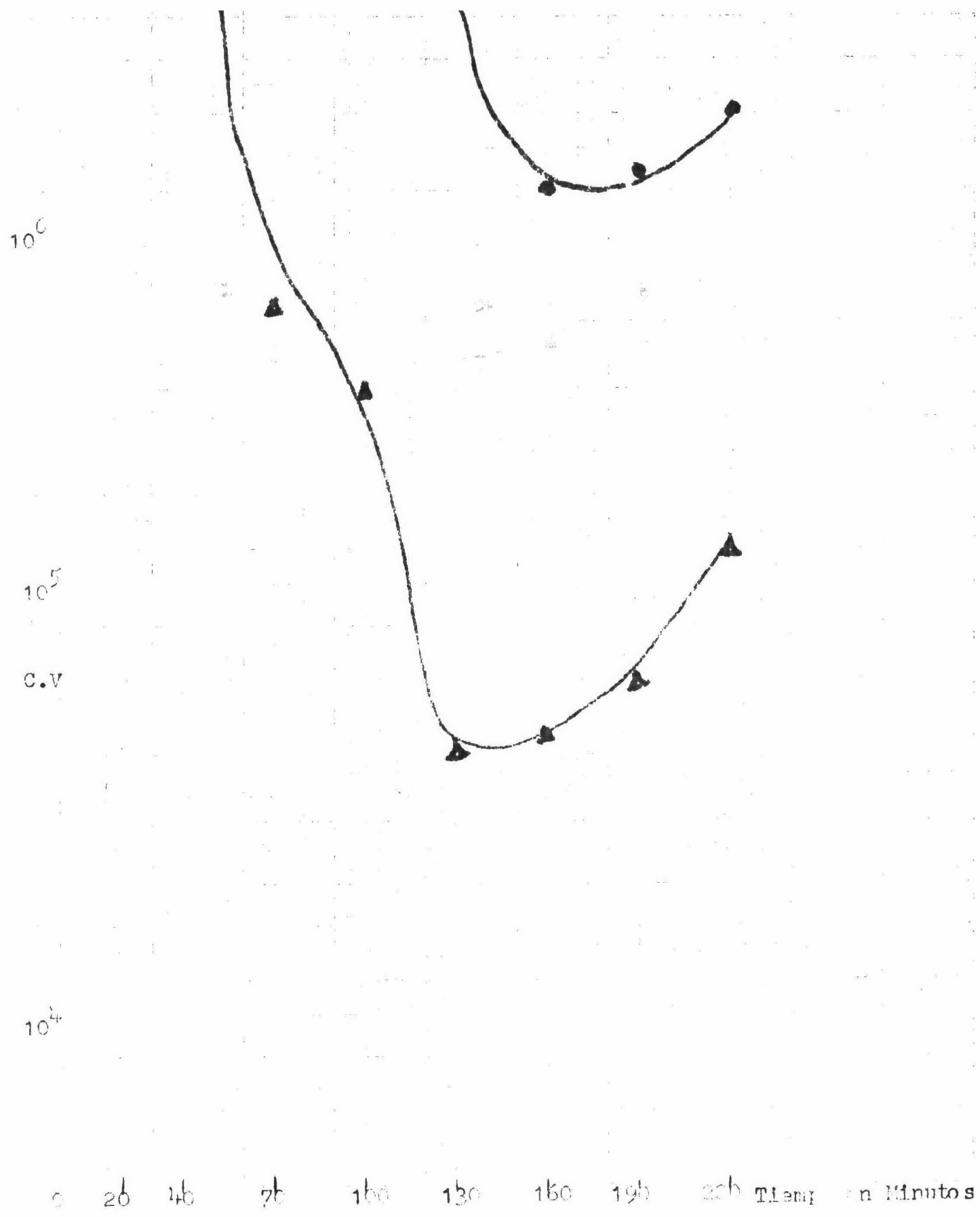
Tie o en Minutos

Idem figura 13 pero Cuentas Viabiles y Tiempo
en vez de U.R. vs T

Muets: Mu-1

JM 222	▲	1	0
JM 920	□	0	1
JM 921	○	1	1
JM 923	×	2	1
JM 924	●	3	1





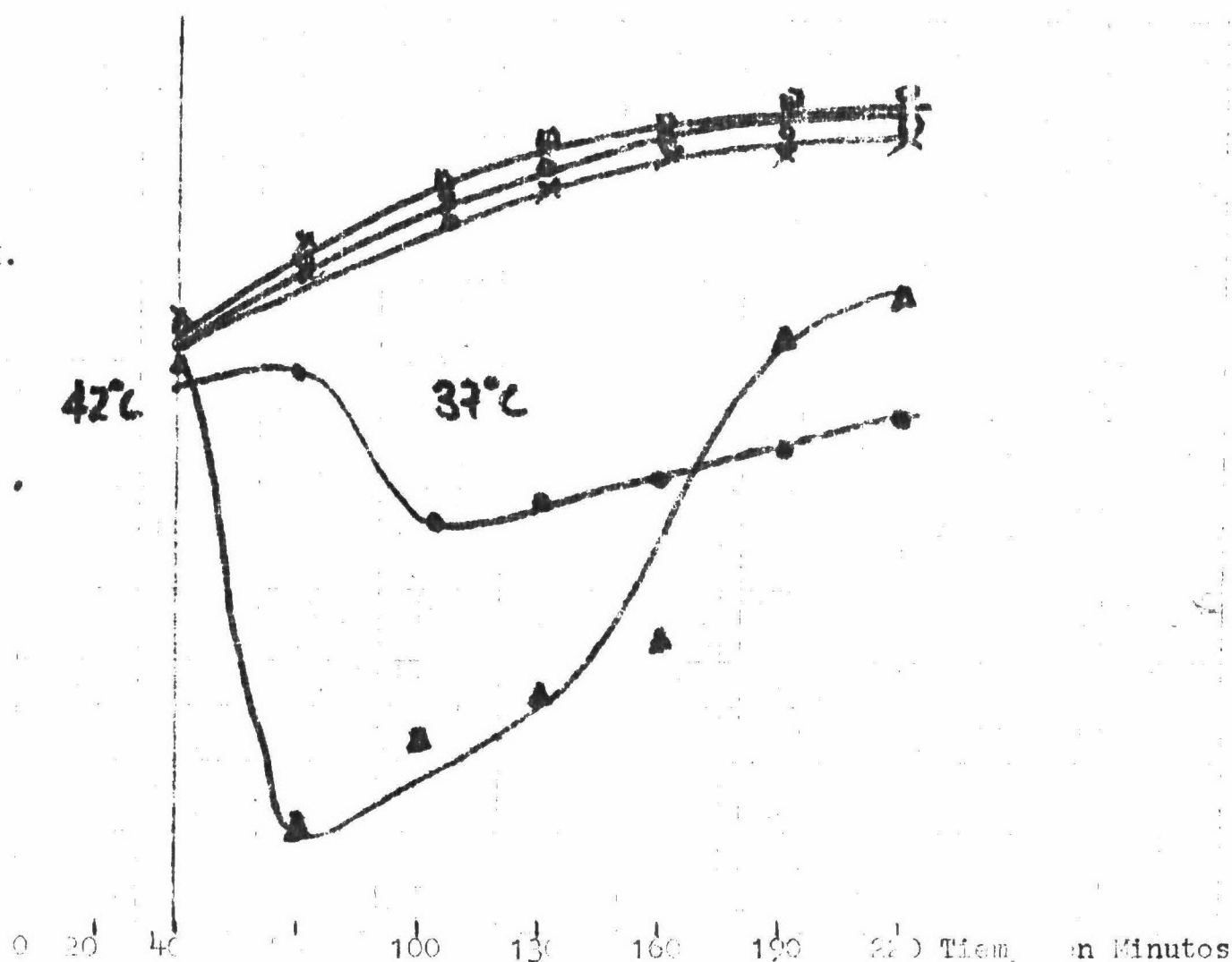
RESULTADOS

FIGURA No. 15

Curva de crecimiento 32°C hasta 60 UK luego se cambia la temperatura a 42.5°C por 40 minutos y luego se cambia a 37°C.

JM 222	▲	Mu cts : Mu-1	1	0
JM 920	■		0	1
JM 921	○		1	1
JM 923	×		2	1
JM 924	●		3	1

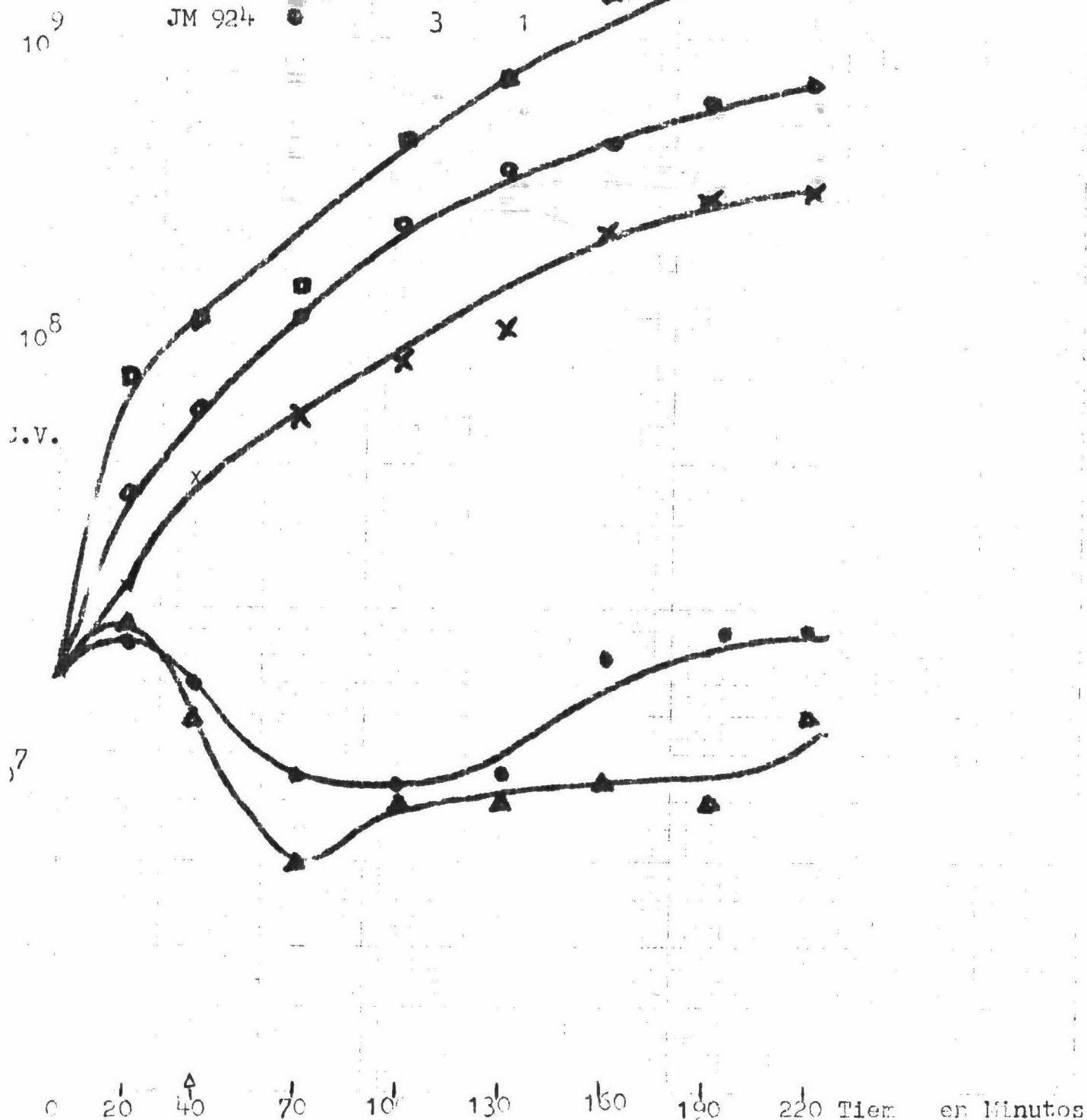
J.K.



Item figura 15 pero C.V. vs T en vez de U. vs T

Mu cts: Mu-1

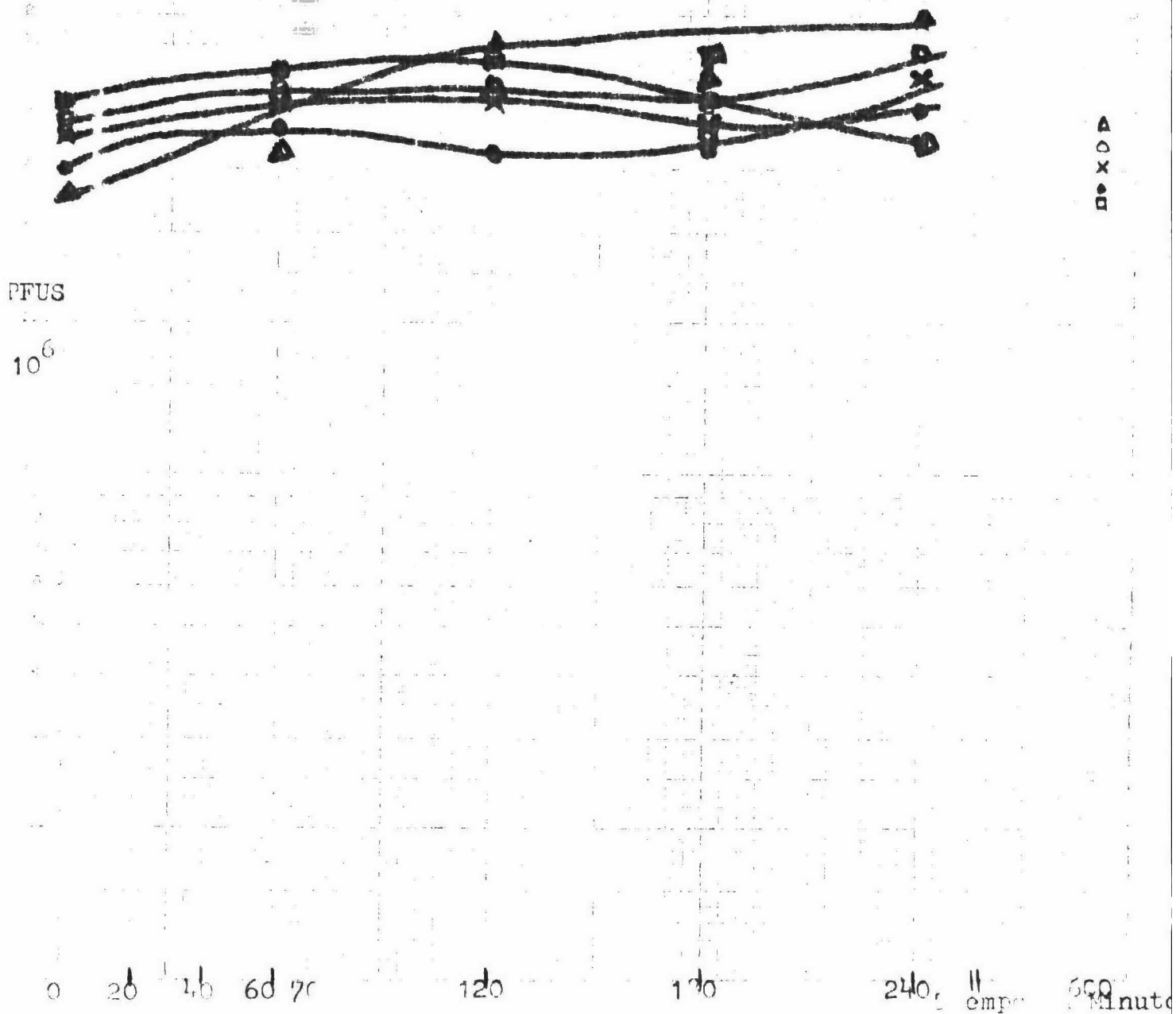
JM 222	Δ	1	0
JM 920	□	0	1
JM 921	○	1	1
JM 923	X	2	1
JM 924	●	3	1



Unidades formadoras de placas vs Tiempo a una temperatura de 32°C

Mu cts: Mu-1

JM 222	▲	1	0
JM 920	◻	0	1
JM 921	○	1	1
JM 923	×	2	1
JM 924	●	3	1



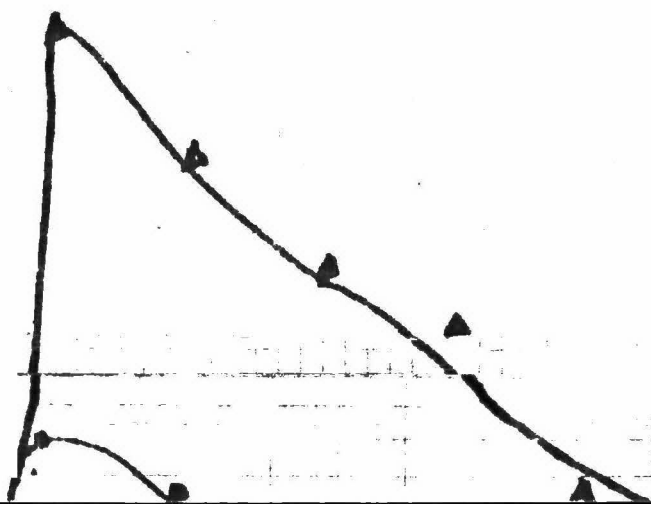
RESULTADOS

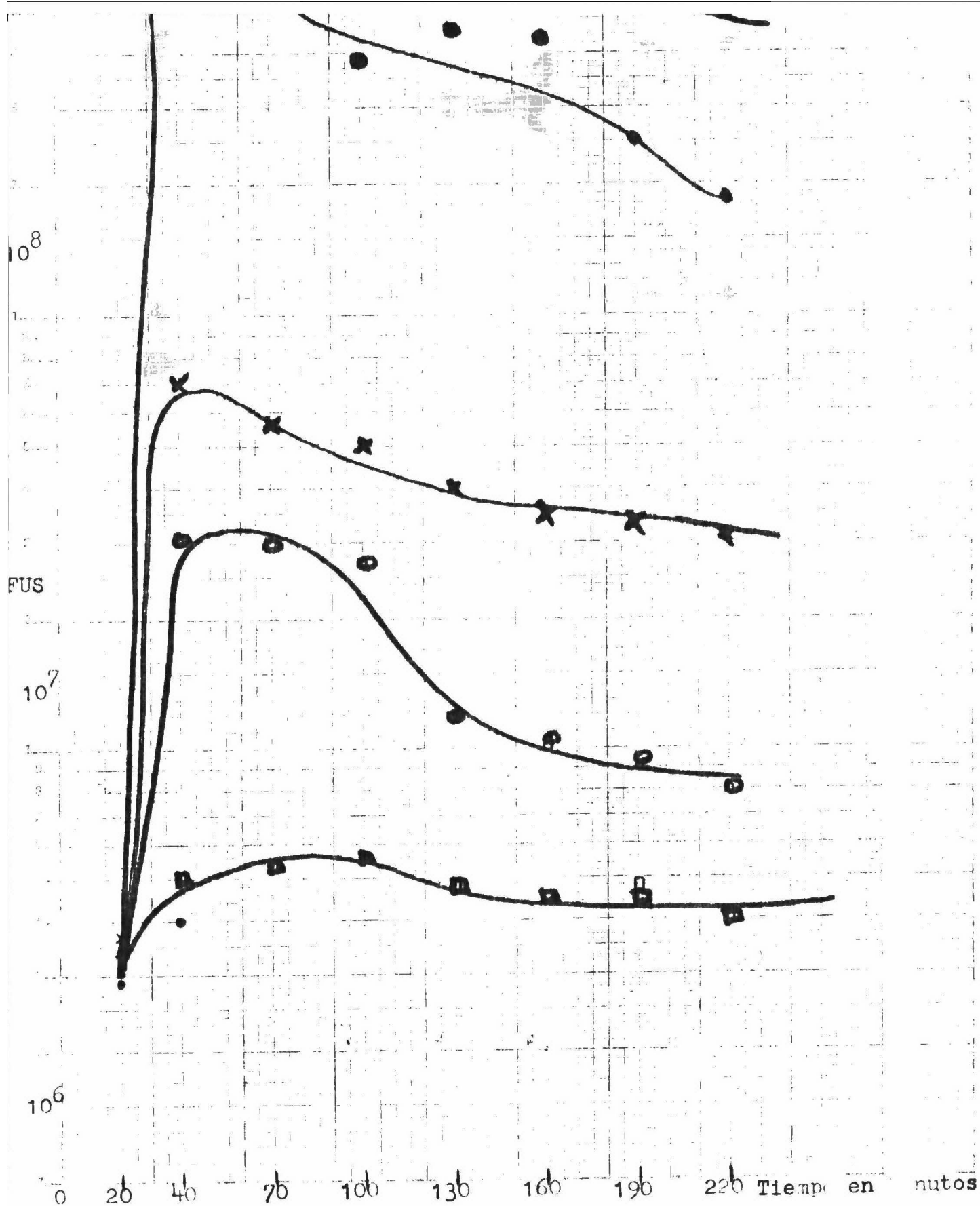
FIGURA No. 18

Unidades formadoras de placas vs Tiempo a una --
temperatura de 32°C hasta 60 UM y luego se cambia
la temperatura a 42.5°C

Mu cts: Mu-1

JM 222	▲	1	0
JM 920	◻	0	1
JM 921	○	1	1
JM 923	×	2	1
JM 924	●	3	1





Discusión y Conclusiones

Como puede observarse en las figuras 13 y 14 cual o una cepa (JM 222) que es portadora de un profago Mu cts es crecida a 32°C hasta 60UK y luego cambiada a 42.5°C , las células se lisan por la inducción del genoma viral. Sin embargo, cepas lisogénicas para ambos profagos de Mu-1 y de Mu cts presentan comportamientos diferentes en función de la relación de los dos profagos. Esto queda de manifiesto en éstas dos figuras en las cuales se observa que la célula JM 924 que es trilisogénica para el profago Mu cts y monolisogénica para el profago Mu-1 se lisa, a diferencia de la mono-mono (JM 921) ó de la bi-mono (JM 923) que presentan patrones parecidos con la monolisogénica para el profago Mu-1 (JM 920).

Es interesante mencionar tal y como se puede constatar en la figura No. 10 que cuando las células son crecidas a 32°C no hay lisis independientemente de la relación de profagos.

Además, otro punto importante es aquel que se observa en las figuras 11 y 12 en las cuales se presentan patrones de crecimiento de éstas cepas pero haciendo el cambio de temperatura de 32°C a 41.5°C . En éstas figuras se puede observar que la lisis que presenta la cepa JM 924 (3 profagos Mu cts 1 profago Mu-1), no es tan clara como cuando se hace el cambio a 42.5°C . Este fenómeno del cambio de 32°C a 41.5°C es similar al que ocurre cuando se hace el cambio de temperatura de 32°C a 37°C . Las figuras 15 y 16 ilustran los patrones de crecimiento de todas estas cepas con la diferencia de que después de mantenerlas a 42.5°C durante 40 minutos, se colocan a 37°C para ver si

se modificaba en algo el patrón de crecimiento con respecto a 42.5°C , cosa que sensiblemente no ocurre.

Uno de los resultados más interesantes es aquel que se presenta en las figuras 17 y 18 que hablan de los patrones de inducción espontánea a 32°C y de inducción por calor a 42.5°C . Como se vé en la figura 17, el patrón de inducción espontánea es el mismo para cualquiera de las cepas, pero el patrón de inducción por calor a 42.5°C es muy diferente para cada una de las células pudiéndose observar una especie de gradiente de unidades formadoras de placas mientras más profagos $\text{Mu}1$ se encuentren en una cepa en la que existe un profago $\text{Mu}-1$.

Los resultados anteriores nos han hecho pensar en un modelo para este sistema que presenta dos tipos de profagos del fago $\text{Mu}-1$, es decir el salvaje y una mutante de temperatura

Cuando una célula monolisogénica para el profago $\text{Mu}1$ es calentada a 42.5°C , ésta célula se lisa tal como ocurre con la cepa JM 222. La razón de esta lisis es la desnaturalización de la proteína represor codificada por el genoma viral y gracias a la cual es posible el fenómeno de lisogenia. Al desnaturalizarse esta proteína, el profago no está ya reprimido y entra al ciclo vegetativo, lisando a la célula.

En una célula lisogénica para el fago $\text{Mu}-1$, no ocurre esta inactivación del represor a 42.5°C ya que el represor es termostable. Obviamente y tal como se mencionó con anterioridad, resultaba interesante el construir una célula lisogénica que contuviera ambos profagos es decir el salvaje y el que codifica para el represor termosensible; observando el comportamiento de ella a 42.5°C .

Inicialmente, se había pensado en un fenómeno de todo ó nada, es decir: que la célula se lisara ó que no lo hiciera.

La primera posibilidad se debería al hecho de que al --- inactivarse el represor termoestable, el profago, al que estaba unida ésta molécula, se indujera. La segunda alternativa se explicaría por la razón de que aún cuando se inactivaran las moléculas de represor termolábil, las moléculas termoestables suplirían a aquellas. Además, si fuera cierta la segunda posibilidad cabría preguntarse si el hecho de ir aumentando el número de profagos Mu cts, llegaría en algún momento a ocurrir la lisis de la célula debido a que las moléculas de represor - codificadas por el profago Mu-1 no alcanzarían a suplir la deficiencia causada por la falta de las moléculas desnaturalizadas.

De acuerdo con la figura No. 14 parecería que la segunda - alternativa era la acertada y que así cuando se encuentran presentes en una célula 3 profagos Mu cts y uno Mu-1 ésta se lisa y antes no.

Sin embargo, éste modelo no encaja con los resultados de - la figura 18 en donde se observa como aumenta el número de unidades formadoras de placas conforme aumenta el número de profagos Mu cts. Los datos muestran un aumento gradual y no de - todo ó nada. Lo anterior nos hace pensar en una posibilidad: en realidad en un cultivo de células con ambos profagos cada - célula existe en un estado metabólico diferente a las vecinas y además es posible que haya un estado más "adecuado" para la - inducción tanto espontánea como por calor. Por lo anterior ---

cuando en una célula se encuentran presentes ambos tipos de profagos y estando de acuerdo con la posibilidad de este estado "adecuado" es factible que cuando la temperatura del cultivo alcance 42.5°C , el represor fágico codificado por el fago mutado se desnaturalize y el represor codificado por el fago Mu-1 no sea capaz de suplir eficientemente ésta deficiencia. Y se dice eficientemente porque si la célula no se encuentra en ese estado "adecuado", el represor fágico codificado por Mu-1 si será capaz de suplir al desnaturalizado. Además, está claro suponer que conforme aumenta el número de profagos Mu cts la ineficiencia aumenta también y por ende el número de partículas fágicas es mayor.

Es interesante mencionar que aún cuando el fenómeno es fácilmente observable en experimentos de inducción por calor, no es fácilmente en experimentos de crecimiento. Además es importante el dato que habla de que pequeñas diferencias de temperatura hacen que los fenómenos cambien en cuanto a velocidad de crecimiento y a unidades formadoras de placas.

Vale la pena mencionar que aún que cuando no se puede inferir con éste tipo de datos cual es el número de represores fágicos preexistentes en una célula, si podría pensarse que no es un número grande. Además, el construir ésta célula permitirá, en buen grado el poder intentar el aislamiento del represor del fago Mu-1.

Por último, y en relación de la posibilidad de obtener revertantes por el genoma del fago Mu-1 ó Mu cts hay que mencionar que entre todos los sobrevivientes que se analizaron en todo tipo de célula, no se encontraron revertantes de mutaciones producidas por los profagos lo cual hace suponer que

B I B L I O G R A P H I A

- 1.- Bortani, G. "Infections bactériophagiques secondaires des bactéries lysogènes" Ann.Inst.Pasteur 49:273, 1953.
- 2.- Burnet, F.M. y McKie, M. "Observations on a permanently lysogenic strain of B. enteriditis gaertner" Austral.J.Exp.Biol.Med.Sci. 6:277, 1929
- 3.- Campbell, A. "Episomes"
Harper and Row Publishers New York (1969)
- 4.- Edgar R. and Lielausis I. "Some steps in the morphogenesis of bacteriophage T₄" J.Mol.Biol 28:131 (1968)
- 5.- EiseNSTARK A. "Structure of mutator phage Mu-1 of E. coli" J. Ultrastructure Research 14:441 (1966)
- 6.- Franflin, N.C., Dove W.F. and Yanofsky C. "The linear insertion of the prophage into the chromosome of E. coli shown by deletion mapping". Biochem. Biophys. Res. Com. 18: 910 (1965)
- 7.- Hayes, W. "The Genetics of Bacteria and their Viruses" 2nd ed. Oxford, England; Blackwell, 1968
- 8.- Hayes, W. "The mechanism of genetic recombination in E.coli" Cold.Spr.Harb.Symp.Quant.Biol. 18: 75, 1953)
- 9.- Ikeda H. "Prophage P1, an extrachromosomal replication unit". Cold.Spr.Harb.Symp.Quant.Biol. 33: 141, (1968)
- 10.- Jacob F. and Monod J. "Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins"
J. mol. Biol. 3: 318, (1961)
- 11.- Jacob F. and Wollman E. "Sexuality and the Genetics of --- Bacteria". Academic Press, New York (1961)

- 12.- Jacob, F. y Wollman, E.L. "Sur les processus de conjugaison et de recombinaison génétique chez E.coli: I. L'induction par conjugaison ou induction zygotique" Ann. Inst. Pasteur 21: 436, (1956)
- 13.- Kaiser A.D. "On the internal structure of bacteriophage λ " J. Gen. Physiol 49: 171 (1966)
- 14.- Kaiser A.D. and Inman R.B. "Cohesion and biological activity of bacteriophage λ DNA". J. Mol. Biol. 13: 78 (1965)
- 15.- Kellenberger G., Zichichi M.L. and Weigle J. "A mutation affecting the DNA content of phage λ ". J. Mol. Biol 3: 399 (1961)
- 16.- Lederberg, J. y Tatum, E.L. "Gene recombination in E.coli" Nature Lond. 158: 558, (1946)
- 17.- Lederberg, J., Cavalli, L.L. y Lederberg, E.M., "Sex compatibility in E.coli" Genetics 37: 720, (1952)
- 18.- Lennox E. "Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1" Virology 1: 190, (1955)
- 19.- Lieb, M. "Studies of heat inducible λ mutants" Virology 29: 367, (1966)
- 20.- Luria S. E. and Darnell S. "General Virology" John Wiley - and Sons. New York (1967)
- 21.- Lwoff, A. y Gutmann, A. "Recherches sur un Bacillus megathérium lysogène" Ann. Inst. Pasteur 28: 71, (1950)
- 22.- Martuscelli J., Taylor A.L. Cumming D.J., Chapman V. ., DeLong S.S. and Caffedo L., "Electron microscopy evidence for linear insertion of bacteriophage Mu-1 in - lysogenic bacteria". J. Virology 3: 551, 1971

- 23.- Rothman J.R., "Transduction studies on the relation -
between prophage and host chromosome"
J. Mol. Biol. 12: 892, (1965)
- 24.- Taylor A. "Bacteriophage induced mutation in E.coli"
Proc. Ntl. Acad. Scien. U.S. 50: 1043 (1963)
- 25.- Thomas C. "The Role of the Ring" J.Cell Physiol 70:13(1966)
- 26.- Torti F., Barksdale C. and Abelson J. "Mu-1 Bacteriophage
DNA " Virology 41: 567, (1970)
- 27.- Zinder N. and Lederberg J. "Genetic exchange in Salmonella"
J. Bacteriol. 64: 679 (1952)
- 28.- Zissler J. "Integration negative (int) mutants of phage λ "
Viorlogy 3: 189 (1967)
- 29.- Taylor A.L. "Current linkage map of E. coli"
Bacteriol Rev. 34: 155 (1970)