

69
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



V N A M

“ INTERACCION FAGO LAMBDA-BACTERIA:
MUTANTES EN LA SINTESIS PROTEICA ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

DAVID VAZQUEZ GONZALEZ

DIRECTOR: DR GABRIEL GUARNEROS PEÑA

ASESOR: M. EN C. GILDA FLORES ROSALES

CUAUTITLAN IZCALLI EDO. DE MEXICO

1993

TESIS CON
EALLA 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 está 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.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE GENETICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL I. P. N. BAJO LA DIRECCION DEL DR. GABRIEL
GUARNEROS PEÑA

INDICE

	RESUMEN.....	3
I	INTRODUCCION.....	5
II	OBJETIVOS.....	14
III	MATERIAL Y METODOS.....	15
IV	RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	24
V	CONCLUSIONES.....	45
VI	REFERENCIAS.....	49
	GLOSARIO.....	52

RESUMEN

Las mutantes de *E. coli* defectivas en la peptidil-tRNA hidrolasa, *pth(t.s.)* y *pth(rap)* inhiben el desarrollo del fago λ . Esta inhibición depende de la transcripción de regiones específicas en el genoma de λ llamadas *bar*. A su vez la transcripción de las regiones *bar* clonadas en plásmidos es letal para las mismas mutantes *pth*. Se investigó si la inhibición del crecimiento del fago λ observada en la cepa *pth(rap)* se puede reproducir en la cepa silvestre aumentando la dosis de transcritos *bar* a partir de plásmidos. Esto sugeriría que *bar* actúa sobre Pth simulando la deficiencia de *pth* observada en cepas *rap*. Para esto se transformaron cepas *rap* con un plásmido portador de secuencias *bar* regulado por el promotor pL. El ensayo de crecimiento del fago en cepas silvestres transformadas con plásmidos portadores de secuencias *bar* muestran que el aumento en la dosis de los transcritos no reproduce la inhibición del crecimiento de los fagos. Este resultado es consistente con la idea de que el RNA de *bar* no modifica los niveles de Pth activa en la cepa silvestre. Con objeto de investigar si la inhibición de λ está acompañada de letalidad incrementada de las mutantes *pth* se analizó la viabilidad de células después de infección. Esta fue de aproximadamente 50% en infecciones tanto por fagos silvestres como λ *bar*. Las respectivas infecciones de las bacterias fueron exitosas por que la adsorción de los fagos a las bacterias fue al menos del 97% del fago total, y la producción de fago λ *bar*⁺ fue 10 veces menor que la del fago producido por la cepa silvestre y fue el 12.2% del fago *bar*⁻

producido por la cepa *rap*. De estos resultados concluimos que no hay correlación entre la inhibición del crecimiento de λ y la letalidad celular.

El RNA de *bar* silvestre transcrito de vectores plasmídicos estimula la capacidad de supresión de codones UGA por una cepa mutante en el RNA ribosomal 16S *rrsb- Δ C1054*. Con el objeto de investigar si existe una correlación entre la supresión de codones UGA y la exclusión de los fagos en la cepa supresora de codones de terminación se probó el crecimiento del fago lambda en la cepa *rrsb- Δ C1054*. En el cual se observó que la cepa *rrsb- Δ C1054* no inhibió diferencialmente el crecimiento de los fagos lambda silvestre y lambda *bar* de lo cual concluimos que la supresión de codones UGA presentes en los transcritos de *bar* no correlaciona con la inhibición del crecimiento de los fagos como se observa en cepas *pth* defectivas, por lo que se pueden considerar fenómenos independientes.

Dado que el gen *pth* de alguna manera está relacionado con el RNA de *bar* y que un efecto de este es suprimir la terminación de codones UGA por *rrsb*(SuUGA- Δ C1054), pensamos que la doble mutante de este supresor con *pth*(ts) tendría un efecto super-supresor en presencia de *bar*, por lo cual se realizó un ensayo de supresión de codones UGA en el fago lambda 370 (Ω_{UGA}) por las cepas *rrsb*-(SuUGA- Δ C1054), *pth*(ts) y *pth*(ts)-*rrsb*-(SuUGA- Δ C1054). En el que se encontró un aumento en la supresión del codón UGA [crecimiento del fago lambda 370 (Ω_{UGA})] por la cepa *pth*(ts)-*rrsb*-(SuUGA- Δ C1054) respecto a las cepas portadoras de las mutaciones por separado.

I INTRODUCCION

La bacteria Escherichia coli es un procariote perteneciente a las Enterobacteriaceas, gramnegativos, facultativos, no formadores de esporas, con flagelos peritricos. Se encuentran principalmente en el intestino de los vertebrados como flora normal o como patógenos. (Davis-Dulbecco, 1985)

El genoma de E. coli es una molécula simple de ADN circular de aproximadamnte 4×10^6 pares de bases, el cual ha sido subdividido por conveniencia en 100 minutos, donde cada minuto comprende 47 kilopares de bases. Hasta el momento se han mapeado más de 1400 genes, a pesar de todo este avance se calcula que solamente cerca de la mitad de los genes han sido mapeados. (Balows y col. 1992)

La bacteria de E. coli es sensible a la infección por bacteriófagos o fagos, que son virus que se multiplican en células bacterianas (Birge, 1991), el fago λ que es uno de los virus más estudiados, infecta células de E. coli, tiene la característica de ser un fago temperado por lo cual puede desarrollarse lítica o lisógenicamente.

El fago λ se adsorve a receptores en la parte externa de la membrana de E. coli que estan codificadas por el gen bacteriano lamB y este es normalmente usado para transportar maltosa al interior de la célula. Ya que la síntesis de este receptor es inducido por la maltosa y suprimido por la glucosa, cultivos de bacteria que seran infectados con λ deberan crecer en medios que contengan maltosa (Hendrix y col.;1983). El genóma del bacteriófago

λ es una de doble cadena de ADN de aproximadamente 50 Kb de longitud que está agrupado en bloques discretos de genes relacionados (Balows y col, 1992, Davis-Dulvecco, 1985). El ADN es transportado por las partículas del bacteriófago como una cadena doble lineal con secuencias de cadena lineal simple complementaria de 12 nucleótidos de longitud en los extremos (llamados extremos cohesivos, sitios cos). Después de la entrada a la bacteria anfitriona los extremos cohesivos se asocian por apareo de bases formando una molécula circular con dos muescas de 12 nucleótidos. Estas muescas son rápidamente selladas por la ADN ligasa del anfitrión, formando una molécula de ADN circular cerrada que sirve como templado para la transcripción durante la fase temprana de la infección. Durante esta fase, una de las siguientes dos vías de replicación se lleva a cabo. El crecimiento lítico o el crecimiento lisógeno (Ausubel-Brent; 1992, Hendrix y col; 1983).

En la vía lítica, el ADN circular viral se replica en dos fases, la replicación temprana y la replicación tardía, obteniéndose muchas copias del ADN virico, un gran número de productos génicos se sintetizan, la progenie de partículas de fagos se ensamblan, y la célula eventualmente libera nuevas partículas de fagos infecciosos por lisis celular (Ausubel-Brent; 1992, Hendrix y col; 1983). El crecimiento lítico comienza con la infección, si un fago no crece lisógenicamente, o posterior a la inactivación del represor λ I existente en una lisógena (Ausubel-Brent; 1992, Hendrix y col; 1983).

Los eventos de transcripción durante el desarrollo lítico se ha dividido en transcripción temprana y tardía en función de los transcritos generados. La transcripción temprana se subdivide en dos fases, la temprana y la temprana tardía. La transcripción temprana inicia desde los promotores, P_L y P^R , los cuales están localizados a la derecha e izquierda, respectivamente, del gen cI (represor). Los transcritos de P_R terminan en t_{R1} y codifican el gen cro . El transcrito a partir de P_L continúan hasta t_{L1} y codifica el gen N . El producto de N es un factor de antiterminación, que permite la transcripción a partir de P_L o P^R proceder a través de t_{L1} y t_{L2} respectivamente. El transcrito P_R N -antiterminado (transcripción temprana tardía), el cual termina en t_{R2} codifica los genes O , P y Q . Las proteínas O y P son requeridas para la replicación del ADN del fago. La proteína Q es otro antiterminador específico para iniciar en un promotor localizado a la derecha de Q llamado P_R . En esta fase la proteína Cro se ha acumulado en cantidad suficiente para unirse al operador O_L y O_R deteniendo la transcripción de los correspondientes promotores. Los transcritos antiterminados por Q (transcripción tardía) desde el promotor P_R proceden a través de otro terminador llamado t_{R3} , y la región tardía del genoma de lambda, posteriormente a través de genes de la cabeza y del tallo, los cuales están unidos a una misma unidad transcripcional dándose la incorporación del ADN del fago circularizado, y finalmente termina en h (Ausubel-Brent; 1991). Los transcritos P_R codifican para proteínas necesarias para el ensamble de la cabeza y el tallo, empaquetamiento del ADN, y lisis

de la célula huésped. Esta expresión secuencial de las funciones del fago permiten la replicación del genoma, el subsecuente empaquetamiento y la lisis de la célula en un orden preciso (Ausubel-Brent; 1991).

Las proteínas de replicación O y P trabajan junto con las proteínas del anfitrión para replicar el ADN. Y las proteínas de empaquetamiento y lisis del bacteriofago (Ausubel-Brent; 1991).

Replicación del ADN.

La replicación durante el crecimiento lítico requiere de proteínas codificadas por el fago y proteínas de la bacteria. La replicación del ADN durante el desarrollo lítico está dividida en fase temprana y tardía. La fase temprana empieza con la inyección del ADN lineal del fago dentro de la célula bacteriana. Este ADN tiene en cada uno de sus extremos secuencias complementarias de cadena sencilla generadas por la ruptura del sitio cos. Estos extremos son ligados por enzimas de la célula para producir una molécula circular cerrada. Después del superenrollamiento por topoisomerasas de la célula, esta molécula es capaz de iniciar la replicación del ADN. La replicación inicia en un sitio único llamado ori, y procede bidireccionalmente. Este tipo de replicación resulta primero en la formación de un estado intermedio de replicación theta y posteriormente en la producción de dos cadenas circulares hermanas (Ausubel-Brent; 1991, Davis-Dulbecco; 1985, Hendrix y col; 1983). Aproximadamente 15 min. después de la infección por el fago, empieza la fase tardía de la replicación. Esta se caracteriza por

enrollamiento de los círculos replicados, los cuales producen largos polímeros (llamados concatenados) de genomas completos del fago (Ausubel-Brent;1991, Davis-Dulbecco;1985).

El producto del gen gam protege los concatenados de la degradación por una exonucleasa codificada por los genes recB y recC del anfitrión. Los concatenados son sustratos para el empaquetamiento (Hendrix y col; 1983).

Empaquetamiento de los fagos y lisis celular.

Pasada la infección, la replicación del ADN y el empaquetamiento del fago ocurren concurrentemente. Una vez que las estructuras de ADN concatenario se ha formado, son condensadas dentro de las procabezas de lambda (partículas de cabezas incompletas). Los sitios cos son reconocidos por proteínas del fago y el ADN se fractura entre los dos sitios cos de los concatenados coincidentes con este empaquetamiento dentro de una sola procabeza (linearizándose el ADN y regenerándose los extremos cohesivos cos). Las proteínas de la cabeza se ensamblan junto con el tallo (el cual se ensambla independientemente) juntándose a la cabeza para formar un fago intacto. El ADN localizado entre dos sitios cos será empaquetado en una forma que pueda ser inyectado si esta entre 38 y 58 kb de longitud. Los eventos posteriores durante el crecimiento lítico, es la lisis de la célula. Las proteínas Nul y A son componentes de la "terminasa" que rompe los sitios cos. Las proteínas B, C, D, E y Nu3 están involucradas en la estructura o ensamblamiento de la cabeza del fago. Las proteínas G, H, I, J, K,

L, M, T, U, V, y Z, están involucradas en la estructura o ensamblamiento del tallo y fibras del tallo. Las proteínas R; S y Rz; S rompe la membrana interna, R y Rz actúan en la degradación de la pared celular, concluyendo así con la lisis celular.

Crecimiento lisogénico.

Durante el crecimiento lisogénico, el genoma del fago infectante se integra dentro del ADN de la bacteria anfitrión por recombinación sitio específica y es subsecuentemente replicado y transmitido a la progenie bacteriana como algún otro gen cromosomal. Durante la lisogenia, solo un gen del bacteriófago se expresa: el gen cI, el cual codifica para el represor. Dentro de la región de inmunidad, que contienen promotores y genes (tales como gI) esenciales para el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia. Las proteínas gII y gIII, gII es requerida para la síntesis de int, gIII protege a gII de la degradación por proteasa del anfitrión. La proteína int junto con las proteínas bacterianas cataliza la integración del fago dentro del genoma. El sitio attP requerido para la integración del fago dentro del genoma bacteriano. Los extremos cos son necesarios para la circularización de la molécula posterior a la infección (Ausubel-Brent; 1991).

Las células lisógenas son inmunes a superinfección por fagos λ adicional portadores de regiones de inmunidad homóloga. Las placas de fagos temperados son turbias por que contienen tanto células lisadas por fagos en crecimiento lítico y células infectadas que se convierten en lisógenas (Davis-Dulbecco; 1985).

El estudio de mutantes bacterianas defectuosas en el crecimiento de virus. i.e. mutantes resistentes al virus, ha permitido elucidar la función afectada en la bacteria anfitriona. De esta manera la investigación de mutantes de E. coli resistentes al crecimiento del bacteriófago λ ha permitido esclarecer los sistemas de replicación, transcripción, antiterminación y recombinación (Friedman y col. 1984).

La mutante *rap* de E. coli es incapaz de sostener el crecimiento vegetativo del bacteriófago λ (Henderson y Weil. 1976). Se ha demostrado que la mutante *rap* afecta al gen *pth*. La peptidil-trNA hidrolasa (Pth) es una enzima que corta peptidil-trNAS a péptidos y trNAS. Esta enzima se encuentra presente en todos los organismos (Menninger, 1983). La función de la Pth es esencial para la célula dado que la inactivación de Pth a 42°C en mutantes *pth* termosensibles resulta en la acumulación de peptidil-trNA, bloqueo de la síntesis protéica y muerte celular (Menninger, 1978). Los resultados de García-Villegas, et al 1991, sugieren que la función Pth participa directa o indirectamente en la inhibición mediada por transcritos *bar*, el hecho de que la vida media del RNA *bar* silvestre aumente en condiciones *pth (rap)* (Pérez-Morga y Guarneros, 1990) es compatible con la posibilidad de que el RNA de *bar* interactue con algún componente bacteriano que lo estabiliza. García-Villegas y col. (1991), observó la formación de complejos los cuales son susceptibles por una parte al tratamiento con proteinasa K y por otro lado a la digestión con RNAsas A y T1, este análisis conlleva a pensar que los complejos son entre RNA de *bar*,

RNAs y proteínas, los cuales conforman la maquinaria traduccional. Murgola y Guarneros (1991) han propuesto un modelo en el que la posible interacción de *bar sea* con el RNAr 16S ya que Murgola et al (1988) aisló una cepa supresora de codones UGA identificando la deleción de una citosina en la posición 1054 del RNAr 16S, esta base forma parte de la hélice 34 que contiene la secuencia 5'-UCAUCA-3' en las posiciones 1199 a 1205, que son complementarias al codón de terminación UGA, el modelo propuesto habla de una posible interacción entre los tripletes 5'-UCA-3' de la helice 34 con el codón de terminación UGA, de tal manera que esta interacción sirva de señal para la terminación de la traducción.

La supresión dada por la mutación $\Delta C1054$ localizada enfrente de los tripletes UCA, hace que estos últimos no aparean con el codón UGA por una alteración conformacional en la hélice 34 y así se ignore el codón de terminación UGA continuandose la lectura del mensajero, incorporandose un aminoacil-tRNA donde no debería de ser. (Murgola et al, 1990).

En esta tesis nos enfocaremos al estudio del efecto de mutantes derivada de *E. coli* afectadas en la maquinaria de la biosíntesis de proteínas sobre el crecimiento del bacteriófago λ , por un lado se analizaran mutantes en el gen *pth* (mutantes *rap* y mutantes *pth ts*) (Henderson y Weil. 1976, García-Villegas et al, 1991), por el otro una mutante supresora de codones UGA [*rrsB*(SuUGA- $\Delta C1054$)] (Murgola et al., 1988), y por último una doble mutante *pth(ts)-rrsB*(SuUGA- $\Delta C1054$) (este trabajo).

Primeramente se analizará el efecto del RNA bar sobre el crecimiento de fagos λ_{bar^+} y λ_{bar^-} en la cepa silvestre induciendo el fenotipo rap, de manera que el RNA bar actúe sobre Pth simulando la deficiencia de Pth observada en cepas rap. posteriormente se investigará el efecto del fago λ_{bar^+} sobre la viabilidad celular de cepas pth(rap), así como el crecimiento de los fagos silvestres y mutantes por la cepa rap.

El interés de estudiar el efecto de bar sobre el crecimiento de fagos por la cepa rrsb(SuUGA- Δ C1054) radica en que las regiones bar presentan secuencias con tripletes UGA que puedan estar involucradas en la inhibición en el crecimiento del fago por supresión de los codones UGA alterando el proceso normal de terminación de la traducción.

A su vez resulta interesante analizar el efecto sobre la supresión de codones UGA por la cepa pth(ts)-rrsb(SuUGA- Δ C1054), ya que bajo estas condiciones se esperaría un efecto supersupresor dado por un sinergismo entre las mutaciones pth(ts) y rrsb(SuUGA- Δ C1054), ya que se ha observado que tanto mutantes pth(ts) y rrsb(SuUGA- Δ C1054) suprimen codones UGA (Murgola y Guarneros, 1991), así como su influencia sobre el crecimiento de los fagos λ_{bar^+} .

II OBJETIVOS:

GENERALES

Analizar si el aumento en la transcripción de bar⁺ simula el defecto en el crecimiento de λ [observado en cepas pth(rap)] en una cepa silvestre.

Investigar el efecto de la transcripción de las secuencias bar silvestres sobre la viabilidad de las células infectadas por fagos λ bar silvestres.

Analizar si existe algún efecto sobre el crecimiento del fago λ bar⁺, cuando este infecta la cepa rrsB(SuUGA- Δ C1054) transformada con plásmidos portadores de DNA bar inducible por pL.

Investigar si existe algún efecto sobre el crecimiento del fago λ bar⁺ cuando este infecta la cepa pth(t.s.)-rrsB(SuUGA- Δ C1054) transformada con plásmidos portadores DNA bar inducible por pL.

Estudiar la posibilidad de algún efecto super-supresor entre las mutaciones pth(ts) y rrsB(Su UGA- Δ C 1054) sobre el crecimiento del fago λ .

PARTICULARES

Transformar las cepas N5960 y N5960rap así como las cepas KL2661, KL2665 y DV2665, DV2661 con los plásmidos pPG110, pPG111 y pDH520.

Transducir los marcadores pth(t.s.)-Tn::10 a la cepa supresora de codones UGA; rrsB(Su UGA- Δ C1054).

III MATERIAL Y METODOS

A) MATERIAL

Medios de cultivo: Luria-Bertani; el cual contienen 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio por litro. El pH se ajusta a 7.2 por adición de NaOH.

El caldo T se prepara como el Luria solo que sin extracto de levadura. Las cajas de agar de L-B y T se preparan como los caldos y la adición de 12 g de agar por litro.

Medio mínimo, M9 5x 33.9g Na_2HPO_4 anh. 15g KH_2PO_4 , 2.5g NaCl, 5g NH_4Cl . Para preparar un litro de M9 glucosa, tiamina. A 200ml de M9 5x se le agrega 750 ml de agua esteril, 20ml de glucosa(20%), 5 ml de tiamina(0.337%). Para M9 glucosa, tiamina ampicilina, es igual que el anterior solo que se añade 1ml de ampicilina (50mg/ml). Para medio M9 glucosa, tiamina ampicilina, indol y 5-metil_{DL}triptofano, al medio anterior se le añade 0.64 ml de indol(0.02M) y 6.5ml de 5-metil_{DL}triptofano. Las cajas de estos medios se preparan por adición de 15 gr de agar.

Cepas bacterianas, fagos y plásmidos (cuadros 1, 2 y 3).

Los plásmidos utilizados son pPG110, pPG111, que son derivados del pDH520. El plásmido pDH520 es un derivado del pBR322, al cual se le inserto un par de fragmentos provenientes del bacteriofago λ , dichos fragmentos corresponden al operador O, y al regulador oLpL, de esta manera el plásmido es regulado por la proteína cI857 que es termoinducible.

CUADRO 1. CEPAS BACTERIANAS.

CEFA	GENOTIPO	REFERENCIA
C600	<i>thr1 leuB6 thi1</i> <i>lacY1 supE44 tonA21</i>	APPLEYARD (1954)
GG990	C600 <i>pth</i> (ts)Tn::10	COLECCION G. GUARNEROS.
DV2661	KL2661 <i>pth</i> (ts)Tn::10	D. VAZQUEZ (1992)
DV2665	KL2665 <i>pth</i> (ts)Tn::10	D. VAZQUEZ (1992)
KL2661	<i>glyV55 Δ(tonB</i> <i>trpAB17)/F'trpA</i> (UGA15).	E. MURGOLA (DONACION 1991)
KL2665	KL2661 <i>rrsB</i> (ΔC1054)	E. MURGOLA (DONACION 1991)
N5960	SA500 <i>his ilv</i> <i>lacZxA21 (λcI857</i> ΔBam Nam7 nam53 ΔH1) <i>cysH</i> ::Tn5	COLECCION NIH
N5960rap	<i>relA</i> ⁺	P. GUZMAN (1984)
Q1	N5960 <i>rap zch</i> ::Tn10 <i>supE lac</i> ⁻	COLECCION G. GUARNEROS
TAP106	<i>hsdR leu thi rpsL</i> <i>supE44 ΔlacU169 gal</i> <i>kam bioA</i> (λint-ral) ΔBam N ⁺ <i>cI857</i> (cro- <i>bioA</i>) ΔN::Kan	D. COURT

CUADRO 2. FAGOS UTILIZADOS

GENOTIPO	FUENTE O REFERENCIA
λ lac trpW205 red114 imm434	G. GUARNEROS (1987)
λ bar101 red114 imm434	GARCIA-VILLEGAS (1988)
$\lambda\Delta b_2$ imm434	
λ^3 intC226 imm434	SHIMADA AND CAMPBELL (1974)
P_{iv}	
M13	

CUADRO 3. PLASMIDOS

PLASMIDOS	CARACTERISTICAS RELEVANTES	ORIGEN O REFERENCIA
pDH520	Promotor pL de λ , Ap' Tc' por inducción	D. HARBRECHT
pPG110	bar ⁺ bajo el control de pL letal para <i>E. coli rap</i> por termoinducción de pL, Ap'	P. GUZMAN (1984)
pPG111	Isógeno a pPG110 que lleva la mutación bar101, se mantiene en <i>E. coli rap</i> , Ap'.	P. GUZMAN (1984)

Soluciones para extracción de plásmidos.

Solución I; 50 mM de glucosa

25 mM Tris-Cl(pH 8)

10 mM EDTA (pH 8)

La solución se esteriliza por autoclave y se guarda a 4°C.

Solución II; 0.2N (dilución fresca de un stock 10 N)

1 % de SDS.

Solución III; 5 M de acetato de potasio..... 60 ml.

acido acético glacial..... 11.5 ml.

agua..... 28.5 ml.

B)METODOS

Propagación de fagos.

Poner en un tubo de cultivo 5 ml de medio Luria e inocular con una colonia de la cepa apropiada, incubar toda la noche a 37°C con agitación, de este cultivo al otro día tomar 100µl y depositar en un tubo al cual añadir posteriormente una placa lítica del fago y se deja reposar 15 min., posteriormente adicionar 5 ml. de medio Luria con CaCl₂ 10mM. y e incubar a 39°C hasta observar lisis (aproximadamente tres horas), añadir 100µl de CHCl₃, e incubar de 5 a 10 min. Centrifugar a 10000g 10 min. en una centrifuga Sorvall RC5B, el sobrenadante pasar a otro tubo, gotear CHCl₃, y guardar el lisado a 4°C.

Preparación de concentrados en caja.

Preparar un cultivo en tubo con 5 ml. de medio Luria-Bertani e inocular con una sola colonia de la cepa apropiada e incubar con agitación toda la noche a 37°C. Centrifugar el cultivo a 1500g por 10 min. y resuspender la pastilla en 2.5 ml. de una solución 10 mM de sulfato de magnesio, mezclar de 10^5 a 10^4 fagos con 0.1 ml. de células en un tubo de cultivo, e incubar a temperatura ambiente por 5 min. Mezclar bien las células y los fagos. Agregar 2.5 ml de medio Luria-Bertani seguido de 2.5 ml de agar suave (a 45°C) y vaciar sobre una caja de medio Luria-Bertani, y dejar gelificar, incubar a temperatura adecuada con las cajas con el fondo hacia abajo de 5 a 7 horas, hasta tener crecimiento confluyente, hasta vaciar sobre la caja con cuidado 2 ml. de solución de dilución del fago y dejar incubando a 4°C po 48 horas. Transcurrido el tiempo tomar con mucho cuidado la solución y pasar a un tubo de centrifuga al cual agregar 0.1 ml. de cloroformo, agitar suavemente con vortex y centrifugar a 4500g por 10 min., rescatar el sobrenadante que es el concentrado de fago.

Extracción de plásmidos.

Inocular con una sola colonia un tubo que contenga 3 ml de medio Luria con el antibiotico apropiado (ampicilina 50 microgramos/ml.) e incubar toda la noche a 37°C. Al otro día centrifugar en tubos eppendorf a 12000g por 30 seg. en una centrifuga Eppendorf 5415C y retirar el sobrenadante tratando que la pastilla quede lo mas seca posible, resuspender la pastilla con

100 μ l de la solución I fría agitar vigorosamente con vortex, posteriormente agregar 200 μ l de solución II, cerrar bien y mezclar el contenido por inversión del tubo cinco veces rápidamente. No agitar con vortex. Guardar el tubo en hielo, agregar 150 μ l. de solución III fría, cerrar el tubo y agitar con vortex suavemente con el tubo invertido por unos 10 seg., guardar el tubo en hielo de 3 a 5 min. Centrifugar a 12000g por un lapso de 5 min. a 4°C, y transferir el sobrenadante a otro tubo limpio, y agregar un volumen de la mezcla fenol:cloroformo (1:1), agitar con vortex, después centrifugar a 12000g por 2 min. a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Las dobles cadenas de ADN se precipitan con dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente, mezclar con vortex y dejar reposar por 2 min. a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 12000g por 5 min. a 4°C en una microcentrifuga, remover el sobrenadante por simple aspiración y colocar el tubo en posición invertida sobre papel absorbente de tal manera que todo el fluido drene hacia abajo, y remover las gotas de fluido adheridas al tubo. Lavar las pastillas de ADN de doble cadena con 1ml. de etanol al 70 % a 4°C, y permitir que la pastilla seque al aire por 10 min., resuspender la pastilla con 50 μ l de TE (pH 8.0). Guardar a -20°C.

Transformación de células con cloruro de calcio.

Estado de competencia; Inocular con una colonia de la bacteria recipiente 500 ml. de medio Luria-Bertani hasta una D.O. a 600 nm de 0.2 enfriar las células por un lapso de 15 a 20 min. en hielo, y transferir a tubos de centrifuga, las células deben mantenerse

entre 0 y 4°C durante los subsecuentes pasos del procedimiento. Centrifugar a 2000g por 15 min., resuspender la pastilla celular con 200 ml. de cloruro de calcio 100 mM frío esterilizado por filtración e incubar la suspensión por 20 min. en hielo, transcurrido el tiempo centrifugar como anteriormente, resuspender la pastilla con 5 ml. de cloruro de calcio 100 mM frío, esterilizado por filtración, incubar las células en hielo de 20 a 24 horas.

Transformación; Agregar la solución de DNA a las células y mezclar suavemente, se recomienda usar un volumen mínimo de solución de DNA (menos de 10 μ l) para obtener buenos resultados. Incubar la mezcla de 30 a 60 min. en hielo y transferir los tubos a 37°C por 2 min., agregar 1 ml. de medio Luria-Bertani e incubar a 37°C por 30 min. espatular las células en un medio selectivo, incubar toda la noche a 37°C.

Análisis del crecimiento de fagos.

De un cultivo de toda la noche de las bacterias sobre las cuales se quiere analizar el crecimiento del fago, tomar 100 μ l y colocar en un tubo de ensayo (5ml) junto con 100 μ l de cada dilución del stock de fagos (10^7 , 10^4 y 10^1), añadir 2.5ml de agar suave fundido (45°C), mezclar y vaciar sobre cajas de T ϕ o T ϕ ampicilina (cuando se requiera), dejar que gelifique e incubar a las temperaturas requeridas.

Protocolo de cuentas viables, centros infectivos, tasa de producción de fagos.

Poner un cultivo durante toda la noche en medio de Luria-Bertani. De dicho cultivo tomar 50 μ l. e infectar con los fagos λ bar+, λ bar-, y dejar un control de bacteria sin infectar. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente 10 minutos a 37°C. Centrifugar los tubos (12000 g por 2 minutos), separar el sobrenadante de la pastilla. Lavar la pastilla dos veces con solución SM esteril, y volver a centrifugar (2 min. a 12000 g). Resuspender la pastilla en 500 μ l de SM.

Cuentas viables: Diluir seriadamente (10^2 , 10^4 , y 10^6) 100 μ l de la suspensión celular, 100 μ l de cada dilución se mezcla con agar suave (45°C) y vaciar en cajas de Luria-Bertani por duplicado.

Tasa de producción: Inocular 10 ml. de medio Luria-Bertani (ampicilina 50 μ g/ml.) con 100 μ l de la suspensión celular e incubar por 1 hora a 37°C, posteriormente agregar cloroformo(100 a 300 μ l). Centrifugar y diluir seriadamente (10^2 , 10^4 , 10^6) los sobrenadantes y gotear sobre un tapiz de la cepa indicadora (Q1).

Centros infectivos: Diluir seriadamente (10^2 , 10^4 y 10^6) los 100 μ l restantes de la suspensión celular y mezclar 100 μ l. de cada dilución con 100 μ l de de una suspensión celular fresca de la cepa Q1, plaquear con agar suave e incubar las cajas a 37°C.

Diluir seriadamente el sobrenadante obtenido ,junto con los fagos infectante y gotear sobre un tapiz de la cepa Q1.

Transducción.

Colocar 5ml de medio Luria-Bertani en un tubo estéril e inocular con una colonia de la cepa receptora e incubar toda la noche. Al día siguiente centrifugar y resuspender la pastilla con 2.5 ml. de la solución de transducción. Hacer la siguiente distribución.

tubo	ml. de suspensión	ml. de lisado
1	0.1	----
2	0.1	0.01
3	0.1	0.05
4	0.1	0.1
5	---	0.1

Incubar 30 min a 30°C, añadir 0.1ml de citrato de sodio 1M y mezclar, añadir 1ml de medio Luria-Bertani e incubar 1 hr. a 32°C, centrifugar la pastilla y resuspender en 0.1 a 0.2 ml de Luria-Bertani con citrato de sodio (10mM), espatular en cajas que contengan el antibiótico apropiado.

Análisis estadístico.

Se utilizo el método "t" de "student" el cual es idoneo para el tipo de datos arrojados por los experimentos que conforman esta tesis.

IV RESULTADOS Y ANALISIS

DE RESULTADOS

Efecto del RNA de *bar* sobre el crecimiento de fagos λ *bar*⁺ y λ *bar*⁻ en la cepa silvestre N5960.

Se investigó si el incremento en la dosis del RNA *bar* actúa promoviendo la inhibición del fago lambda en una cepa silvestre N5960, (simulando así el fenotipo *rap* de inhibición del crecimiento del fago λ *bar*⁺). Mediante aumento en la dosis de RNA *bar* por inducción de la transcripción de los plásmidos pDH520, pPG110 y pPG111 regulados por el represor *cI857*. Se realizaron ensayos de crecimiento de fagos en cepas N5960 y N5960*rap* transformadas con los plásmidos. Los resultados (CUADRO 4) muestran que el aumento en la dosis del RNA de *bar* no causa inhibición del crecimiento de los fagos λ *bar*⁺, λ *bar*⁻ y λ Δb_2 , en la cepa silvestre (líneas 7, 8 y 9) como sucede en la cepa *rap* (líneas 10, 11 y 12). La transcripción de *bar* por plásmidos en multicopia no afecta el crecimiento de los fagos en la cepa silvestre.

En la línea 10 no se puede analizar el crecimiento de los fagos por la ausencias de crecimiento bacteriano dado por el efecto letal de los transcritos *bar* sobre la cepa *rap*.

La inhibición del fago *bar*⁻ en la línea 11 se considera no significativa ya que este tipo de datos no son reproducibles. Dentro de la serie de experimentos que sirvieron para conformar este cuadro se observaron desviaciones como la observada en la línea 7 y línea 11. No sucede así con los resultados conclusivos

que en todos los casos mostraron la tendencia señalada. La bacteria *rap* transformada parece inhibir el crecimiento del fago $\lambda_{bar^{101}}$ (línea 11) esta inhibición aparentemente depende de la transcripción de la región *bar* inducida ya que tanto *bar*⁺ como *bar*¹⁰¹ inhiben y no así el vehículo plasmidico (línea 12), estos resultados requieren de mayor estudio para poder plantear conclusiones sólidas. El análisis de esta tabla presenta dificultad ya que resulta complicado señalar diferencias claras entre datos como $+10^7$ y $\pm 10^4$, ya que observar una placa confluyente en una dilución hace esperar placas aisladas en la dilución siguiente.

CUADRO 4. ANALISIS DEL CRECIMIENTO DE LOS FAGOS λ bar⁺ Y λ bar⁻ EN LA CEPA MUTANTE rap Y SILVESTRE EN PRESENCIA DE TRANSCRITOS DEL RNA DE bar POR PLASMIDOS.

	32°C		
	λ bar ⁺	λ bar ⁻	$\lambda\Delta b_2$
1 N5960/pPG110	+/- (10 ⁻⁶)	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁶)
2 N5960/pPG111	+/- (10 ⁻⁶)	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁶)
3 N5960/pDH520	+/- (10 ⁻⁶)	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁶)
4 N5960rap/pPG110	+(10 ⁻²)	+(10 ⁻²)	+/- (10 ⁻⁴)
5 N5960rap/pPG111	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁶)
6 N5960rap/pDH520	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁴)
	40°C		
7 N5960/pPG110	+/- (10 ⁻⁶)	+(10 ⁻²)	+/- (10 ⁻⁶)
8 N5960/pPG111	+/- (10 ⁻⁶)	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁶)
9 N5960/pDH520	+/- (10 ⁻⁶)	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁶)
10 N5960rap/pPG110	*	*	*
11 N5960rap/pPG111	+(10 ⁻²)	+(10 ⁻²)	+/- (10 ⁻⁴)
12 N5960rap/pDH520	+(10 ⁻²)	+/- (10 ⁻⁴)	+/- (10 ⁻⁶)

Los signos indican: + placa lítica confluyente, +/- placas líticas aisladas, - ausencia de placas líticas.

Título de los fagos; λ bar⁺ 5x10⁹, λ bar⁻ 3x10⁵ y $\lambda\Delta b_2$ 1x10¹⁰

* no hubo crecimiento bacteriano. Entre parentesis señalamos aquella dilución del lisado de fagos en que se observaron placas líticas.

EFEECTO DEL FAGO λ_{bar} SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE CEPAS $pth(rap)$.

Se analizó el efecto de bar^+ sobre la viabilidad de células rap , y la influencia sobre el crecimiento de λ_{bar^+} y λ_{bar^-} .

La viabilidad celular observada en la infección de la cepa $pth(rap)$ (CUADRO 5) es de aproximadamente el 50% tanto por fagos λ_{bar^+} como λ_{bar^-} respecto a la viabilidad observada por las células infectadas por $\lambda\Delta b_2$ (FIGURA 1). Las respectivas adsorciones de los fagos a las bacterias fue al menos del 97% del fago total añadido en todo los casos, la producción de fago λ_{bar^+} por la cepa $pth(rap)$ fué 7.58% del fago producido por la cepa silvestre y fue el 12.2% del fago λ_{bar^-} producido por la cepa mutante $pth(rap)$ (FIGURA 2).

La inhibición del crecimiento fágico no esta dado por la baja en la viabilidad de rap , la mortandad es un efecto propio de las mutantes $pth(rap)$ al ser infectada por fagos λ , independientemente del RNA de bar^+ o bar^- .

La discrepancia observada entre el porcentaje de fago adsorbido y el porcentaje de célula infectada se puede atribuir a un error de manipulación, durante los experimentos se busco corregir esta discrepancia pero no conseguimos eliminarla.

CUADRO 5. EFECTO DE LOS FAGOS λ_{bar}^+ Y λ_{bar}^- SOBRE LA VIABILIDAD

DE LAS CELULAS rap.

CEPA/FAGO	VIAB.	FAGO. PROD.	FAGO SOBRN.	CENT. INFECT.
C600	1.8×10^7	-----	-----	-----
C600 λ^+	1.5×10^7	5.2×10^7	6.0×10^6	9.0×10^6
C600 λ^-	1.9×10^7	6.5×10^7	1.5×10^6	1.7×10^7
C600 λ^*	1.8×10^7	9.0×10^7	4.5×10^6	8.2×10^6
C600rap	4.3×10^7	-----	-----	-----
C600rap $^+$	1.5×10^7	4.9×10^6	3.5×10^6	1.1×10^7
C600rap λ^-	1.7×10^7	9.0×10^7	1.5×10^6	2.5×10^7
C600rap λ^*	2.9×10^7	2.7×10^8	7.0×10^6	2.1×10^7

CEPA/ FAGO	% DE CEL. INFECC.	% DE VIABILID	FAGO PROD POR CEL	% DE FAGO ABSOR.
C600/ λ^+	50	83.3	5.8	97.6
C600/ λ^-	94.4	105.5	3.8	99.0
C600/ λ^*	45.3	100.0	11.0	98.2
C600rap/ λ^+	25.8	34.9	0.44	98.6
C600rap/ λ^-	59.1	39.5	3.6	99.0
C600rap/ λ^*	48.8	67.4	12.8	97.0

λ^+ : $\lambda_{lac trp}$ W205 red 114 imm434

λ^- : λ_{bar} 101 red 114 imm434

λ^* : $\lambda_{\Delta b_2}$ imm434

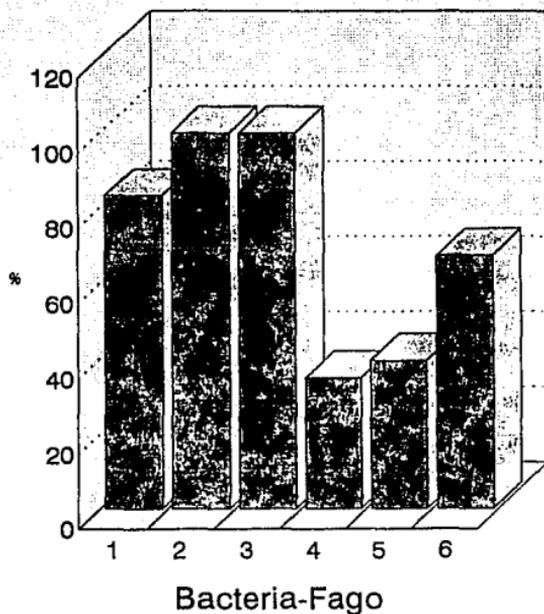
m.o.i de 5 para C600 y m.o.i de 14 para C600rap.

Los títulos de los fagos empleados fueron:

FAGO	TITULO	Vol. tomado para tener 2.5×10^8
λ^+	2×10^{10} ufp/ml	12.5 μ l
λ^-	1×10^{10} ufp/ml	25.0 μ l
λ^*	5×10^{10} ufp/ml	5.0 μ l

La cepa C600 se trabajó a una D.O de 0.744 . La cepa C600rap se trabajo a una D.O. de 0.684

VIABILIDAD CELULAR

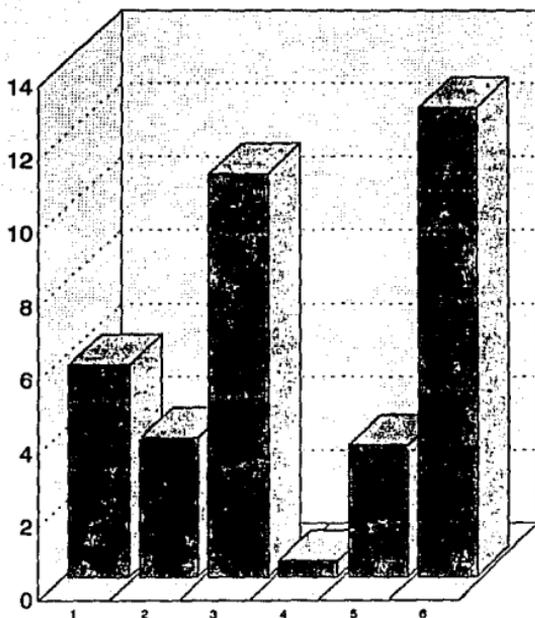


bar+: fago lambda bar+; bar-: fago lambda bar101; bar*: fago lambda deleción b2
1: C600 bar+ 2: C600 bar- 3: C600 bar*
4: C600rap bar+ 5: C600rap bar- 6: C600rap bar*

- 1 Presenta diferencia significativa con 4.
- 2 Presenta diferencia significativa con 5.
- 3 No presenta diferencia significativa con 6.

FIGURA 1. REPRESENTACION GRAFICA DE LA VIABILIDAD DE CELULAS SILVESTRES Y rap INFECTADAS POR FAGOS bar+ Y bar-.

FAGO PRODUCIDO POR CELULA



bar+: fago lambda bar+; bar-: fago lambda bar101; bar*: fago lambda deleción b2
1:C600 bar+, 2:C600 bar-, 3:C600 bar*
4:C600rap bar+, 5:C600rap bar-, 6:C600rap bar*

- 1 Presenta diferencia significativa con 4.
- 2 Presenta diferencia significativa con 5.
- 3 No presenta diferencia significativa con 6.

FIGURA 2. REPRESENTACION GRAFICA DE LA PRODUCCION DE FAGOS POR LAS CEPAS SILVESTRE Y rap INFECTADAS POR FAGOS bar+ Y bar-.

EFFECTO DE *bar* SOBRE EL CRECIMIENTO DE FAGOS λ POR LA CEPA *rrsB*(SuUGA- Δ C1054) SUPRESORA DE CODONES UGA.

En el CUADRO 6-A se observa el ensayo de supresión de tripletes UGA por la cepa KL2665 [*rrsB*(SuUGA- Δ C1054)] y la cepa NK5336, por crecimiento del fago λ_{370} (el cual contiene un codón UGA en el gen O).

En el CUADRO 6-B se muestra el porcentaje de células que mantienen los plásmidos lo cual nos garantiza la transcripción de *bar*. En el CUADRO 6-C observamos el ensayo de crecimiento de las cepas transformadas en medio mínimo con triptofano y ampicilina (50 μ g/ml.), en el que se busco reproducir la supresión observada por Murgola-Guarneros(1991).

Se investigó si los transcritos *bar* influyen sobre el crecimiento de fagos λ_{bar^+} y λ_{bar^-} por la cepa supresora *rrsB*(SuUGA- Δ C1054) mediante un ensayo de crecimiento de fagos en la cepa *rrsB*(SuUGA- Δ C1054) transformada con plásmidos portadores de la región *bar^+* (pPG110). Encontramos que la mutante *rrsB*(SuUGA- Δ C1054) no inhibe diferencialmente el crecimiento de los fagos λ silvestre y λ_{bar^-} (CUADRO 6-D). En el CUADRO 6-E observamos la relación porcentual entre el crecimiento de los fagos en la cepa supresora *rrsB*-1054 en presencia de transcritos *bar^+*. La FIGURA 3 explica los datos del CUADRO 6-E. En las líneas 1, 2 y 3, así como en las líneas 7, 8 y 9 observamos disminución en el crecimiento de los fagos. Esta inhibición depende de los transcritos *Bar^+*, no es comparable con la observada en sistemas *pth(rap)* y no depende de la mutación supresora *rrsB*-1054.

CUADRO 6-A ANALISIS DE SUPRESION POR LA CEPA *rrsB*-(Δ C1054).

CONFIRMACION DE LA SUPRESION DE UGA POR <i>rrsB</i> -(Δ C1054)			
CEPA	FAGO λ bar ⁺	λ bar ⁻	λ 370
C600pth(ts)	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻²
KL2661	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻²
KL2665	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁴
NK5336	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶

λ bar⁺: λ lac trp W205 red 114 imm434

λ bar⁻: λ bar 101 red 114 imm434

λ 370: λ b₂₂₁ cI₁₃₇ cI::Tn10 O_{UGA}

KL2665 es la portadora de *rrsB*-(Δ C1054)

KL2661 es isógena.

El criterio utilizado para asegurarnos que la cepa utilizada presenta la mutación supresora Δ C1054 es el crecimiento del fago λ O_{UGA}.

Los signos + y - indican crecimiento o no en las diluciones indicadas.

CUADRO 6-B. PORCENTAJE DE MANTENIMIENTO DE PLASMIDOS

CEPA	# DE COLONIAS EN: LURIA	COLONIAS EN: LURIA AMP.	% DE CELULAS QUE MANTIENEN PLASMIDOS
KL2661/pDH520	116	108	93.1
KL2661/pPG110	63	48	76.2
KL2661/pPG111	199	167	83.9
KL2665/pDH520	96	77	80.2
KL2665/pPG110	27	23	85.2
KL2665/pPG111	36	37	102.7
N5960rap/pPG110	54	15	27.8
N5960rap/pPG111	36	33	91.7

Se tomo una asada de una caja con crecimiento confluyente y se resuspendió en sol. SM se hicieron diluciones y se espatularón.

CUADRO 6-C. ANALISIS DE CRECIMIENTO EN MEDIO MINIMO CON AMPICILINA (50 μ g/ μ l.) DE LA CEPA *rrsB*-(Δ C1054) TRANSFORMADA CON LOS PLASMIDOS pPG110, pPG111 Y pDH520.

Las cepas KL2661/pPG110, KL2661/pPG111 y KL2665/pDH520; KL2665/pPG110, KL2665/pPG111 y KL2665/pDH520 se estirarón en cajas de M-9 glucosa, triptofano ampicilina.

CEPA	M9 GLUCOSA TRP. AMP.
KL2661/pPG110	++
KL2661/pPG111	+++
KL2661/pDH520	+++
KL2665/pPG110	+
KL2665/pPG111	++
KL2665/pDH520	++

INCUBADAS A 32°C POR 18 hrs.

Los signos intentan mostrar un gradiente de crecimiento.

**CUADRO 6-D. ANALISIS DEL CRECIMIENTO DE FAGOS λ POR LA
CEPA SUPRESORA DE CODONES UGA λ rgB(SuUGA- Δ C1054)**

FAGOS	λ bar ⁺	λ bar ⁻	$\lambda\Delta b_2$
CEPA			
KL2661/pPG110	1.4X10 ¹⁰	2.1X10 ⁹	3.6X10 ¹⁰
KL2661/pPG111	2.3X10 ¹⁰	2.7X10 ⁹	5.6X10 ¹⁰
KL2661/pDH520	2.9X10 ¹⁰	3.2X10 ⁹	6.6X10 ¹⁰
KL2665/pPG110	9.7X10 ⁹	1.6X10 ¹⁰	2.0X10 ¹⁰
KL2665/pPG111	1.8X10 ⁹	1.7X10 ⁹	2.3X10 ⁹
KL2665/pDH520	2.6X10 ¹⁰	4.2X10 ¹⁰	5.2X10 ¹⁰

Los datos estan en u.f./ml. (Unidades Formadoras de Placas).

**CUADRO 6-E RELACION ENTRE EL CRECIMIENTO DE LOS
DIFERENTES FAGOS POR LAS CEPAS TRANSFORMADAS CON LOS PLASMIDOS
pPG110 Y pPG111 RESPECTO AL CRECIMIENTO OBSERVADO POR LAS CEPAS
TRANSFORMADAS CON EL PLASMIDO pDH520.**

	CEPA/PLASMIDO/FAGO / CEPA/PLASMIDO/FAGO	PORCIENTO
1	KL2661/pPG110 λ^{bar+} /KL2661/pDH520 λ^{bar+}	49.2%
2	KL2661/pPG110 λ^{bar-} /KL2661/pDH520 λ^{bar-}	64.7%
3	KL2661/pPG110 λ^{bar*} /KL2661/pDH520 λ^{bar*}	53.9%
4	KL2661/pPG111 λ^{bar+} /KL2661/pDH520 λ^{bar+}	79.9%
5	KL2661/pPG111 λ^{bar-} /KL2661/pDH520 λ^{bar-}	84.4%
6	KL2661/pPG111 λ^{bar*} /KL2661/pDH520 λ^{bar*}	84.4%
7	KL2665/pPG110 λ^{bar+} /KL2665/pDH520 λ^{bar+}	49.0%
8	KL2665/pPG110 λ^{bar-} /KL2665/pDH520 λ^{bar-}	78.3%
9	KL2665/pPG110 λ^{bar*} /KL2665/pDH520 λ^{bar*}	50.0%
10	KL2665/pPG111 λ^{bar+} /KL2665/pDH520 λ^{bar+}	80.0%
11	KL2665/pPG111 λ^{bar-} /KL2665/pDH520 λ^{bar-}	73.9%
12	KL2665/pPG111 λ^{bar*} /KL2665/pDH520 λ^{bar*}	80.8%

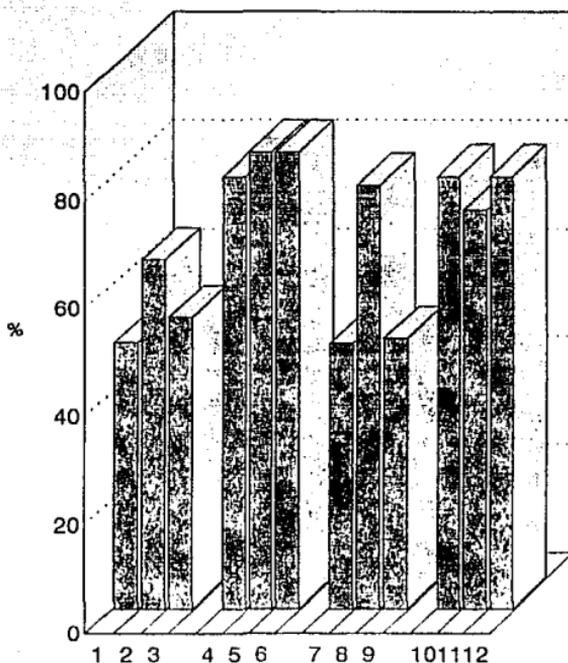
λ^{bar+} : $\lambda_{lac trp}$ W205 *red* 114 *imm*434

λ^{bar-} : λ_{bar} 101 *red* 114 *imm*434

λ^{bar*} : $\lambda_{\Delta b}$, *imm*434

El crecimiento fágico observado en las cepas KL2661 y KL2665 transformadas con el plásmido pDH520 se considera el 100%.

CRECIMIENTO DE LOS FAGOS CON LAS CELULAS TRANSFORMADAS
CON LOS PLASMIDOS pPG110, pPG111 Y pDH520



- 1 No presenta diferencia significativa con 7,
- 2 No presenta diferencia significativa con 8,
- 3 No presenta diferencia significativa con 9.

FIGURA 3. REPRESENTACION GRAFICA PORCENTUAL DE LOS DATOS
PLANTEADOS EN EL CUADRO 6E.

TRANSDUCCION DE LOS MARCADORES *pth(ts)-Tn::10* A LA CEPA SUPRESORA DE CODONES UGA (KL2665) A PARTIR DE LA CEPA DONADORA GG990 (C600 *pth(ts)-Tn::10*).

Los candidatos obtenidos a partir de transducir con el fago $P_{1w}/C600pth(ts)Tn::10$. De la cepa KL2661 (isógena de KL2665 no porta la mutación supresora de codones UGA) se obtuvieron 90 candidatos *tet'*, de la KL2665, 17 candidatos *tet'* y como control de transducción se uso la cepa C600 de la cual se obtuvieron 37 candidatos *tet'*. Todos los candidatos se probaron para crecimiento a 42°C y solo uno resultó termosensible, (de la cepa KL2665) al cual se le denominó DV2665. Debido a que la resistencia a tetraciclina se confiere por el transposon *Tn::10*, el cual bajo presión (presencia de tetraciclina) induce a que *Tn::10* se disperse por el genoma bacteriano, al hacer la transducción y rescatar resistentes a tetraciclina, no solo se rescato a aquellos que cotransducen *pth* sino también aquellos *Tn::10* que cotransducen con otros marcadores adyacentes a donde se inserto. Los ensayos que indican que el candidato obtenido es de interés son el análisis de termosensibilidad, crecimiento en tetraciclina, sensibilidad al fago M13, crecimiento en medio mínimo-triptofano y la inhibición del crecimiento de fagos λ bar', (CUADRO 7-A). Razón por la cual el candidato se probó para dichos ensayos. Transducción de la cepa KL2661 con *pth(ts)-Tn::10*, a partir de un fago $P_{1w}/DV2665 pth(ts) Tn::10$. Los candidatos obtenidos fueron 95 de los cuales 58 resultaron termosensibles (con un porciento de cotransducción del 59.79%). Las cepas obtenidas se denominarán DV2661, a las cuales se

les probó sensibilidad a la temperatura, crecimiento en tetraciclina, sensibilidad a M13, crecimiento en medio mínimo con triptofano, las cuales resultaron en lo esperado (CUADRO 7-A).

**CUADRO 7-A. ENSAYOS DE IDENTIDAD DE LOS CANDIDATOS
 TRANSDUCIDOS PARA OBTENER LA CEPA *pth(ts)* Tn::10 *rrsB*(Su-UGA
 AC1054).**

cepa	M9-G	M9-G- trp.	M9-G-thr- leu-thi.	Tetra- ciclina	fago M13
C600 <i>pth(ts)</i>	-	-	+	+	-
KL2665	-	+	-	-	+
DV2665	-	+	-	+	+
DV2661	-	+	-	+	+

Las cepas DV2665 y DV2661 se ensayarón a diferentes temperaturas su influencia sobre el crecimiento de fagos λ *bar*⁺ *bar*⁻.

EFFECTO DE LA SUPRESION DE CODONES UGA POR LA MUTANTE *pth(ts)*-*SuUGA*
AC1054.

Se construyo la cepa supresora *rrsB(SuUGA-AC1054)*-*pth(ts)* el CUADRO 7-A muestra el ensayo hecho a los candidatos transducidos, el experimento de interés no se pudo realizar ya que al transformar la cepa *rrsB(SuUGA-AC1054)-pth(ts)* con plásmidos portadores de secuencias *bar* sivistres (CUADRO 8-B) no se obtienen candidatos viables.

Entonces se pensó que el problema era a nivel del mantenimiento de los plásmidos por lo que en los experimentos subsecuentes se buscó introducir a las cepas KL2661 y KL2665 el represor termosensible del fago λ *cI857*. La estrategia fue por transducción con el fago P_{vir} , partiendo de la cepa donadora TAP106; *hsd R*, *leu*, *thi*, *rps L*, *sup E44*, Δ *lac U169*, *gal*, *Kam*, *bioA* (λ *int-ral*) Δ *Bam*, *N⁺*, *cI857*, (*cro-bioA*) Δ *N::Kan*. Se checó el genotipo de la cepa por crecimiento en medio Luria kanamicina (50 μ g/ml.) y por crecimiento del fago inmunidad lambda a 42°C, pero no a 32°C. Posteriormente se hicieron los lisados de P_{vir} . Se obtuvieron 13 candidatos Kanamicina resistente de la cepa KL2661 y ninguno de la cepa KL2665. A los candidatos se les checó la presencia del represor *cI857*, de los cuales solo 9 permiten el crecimiento de fagos λ a 42°C pero no a 32°C (a esta cepa se le denominó DV106). A partir de dos de estos candidatos se obtuvo un lisado P_{vir} para nuevamente hacer la transducción para introducir *cI857::Tn5* a la cepa KL2665. La transducción no fue factible ya que no se obtuvieron candidatos. En un ensayo en el que las cepas DV003 se

someten a crecimiento a temperaturas entre 40° a 42°C, se observo que estas no crecen eficientemente, es decir esta cepas son termosensibles, quizá esto explique de alguna manera el porque las cepas KL2665 no pudieron transducirse ya que de alguna manera la inserción de cI857 resulta letal para estas células, así como la inserción en KL2661 resultó en hacerlas termosensibles por lo que se buscó introducir a estas cepas un regulador termoinducible; cI857, lo cual tampoco fue posible ya que no se obtuvieron candidatos.

La cepa *pth(ts)-rrsB(SuUGA-ΔC1054)* no soporta la transcripción constitutiva de *bar⁺*, ya que la transcripción de *bar⁻* si es tolerada.

En el análisis de supresibilidad con la cepa *pth(ts)-SuUGA ΔC1054* (CUADRO 8-B) se observó un aumento en la supresión del codón UGA en el fago λ370 por cepas *pth(ts)-SuUGA(ΔC1054)*, respecto a *pth* y *ΔC1054* por separado. La mutante *pth(ts)-ΔC1054* suprime más eficientemente el fago λ370.

No se logró observar la supresión del codón UGA en la cepa portadora de la mutación *rrsB(SuUGA-ΔC1054) trpUGA15* mediante el ensayo utilizado por Murgola (Murgola y Guarneros, 1991), más sin embargo la cepa es sensible al fago M13, además de que crece bien en medio mínimo glucosa, tiamina, indol(5μg/ml) y 5-metil-DL-triptofano(50μg/ml).

Murgola y Guarneros señalan que la supresión por *pth* en medio mínimo decrece al aumentar la temperatura, esto se debe a que la mutante *pth* es termosensible. Creemos que la supresión de λ370(*O_{UGA}*)

se favorece a temperaturas elevadas en las cuales todavía se permita el crecimiento de las cepas termosensibles.

Posiblemente el gradiente de no funcionalidad de la enzima Pth permita un mayor crecimiento del fago λ_{UGA} . No se logró observar la supresión del codón UGA en la cepa portadora de la mutación *rrsB(SuUGA- Δ C1054) trpUGA15*, más sin embargo la cepa es sensible al fago M13, además de que crece bien en medio mínimo glucosa, tiamina, indol(5 μ g/ml) y 5-metil-DL-triptofano(50 μ g/ml).

Los fenómenos de supresibilidad de UGA e inhibición del crecimiento del fago λ obedecen a mecanismos diferentes que podrían tener en común defectos en la enzima Pth. Al parecer la supresión de λ_{UGA} por *pth(ts)* se ve afectada por la temperatura ya que a 40°C λ_{UGA} crece en 10⁴ mientras que a 37°C crece en diluciones de 10².

CUADRO 8-A. TRANSFORMACION DE LA DOBLE MUTANTE CON EL PLASMIDO PORTADOR DE SECUENCIA *bar*.

Se hicieron las cepas DV2665 y DV2661 competentes por el método del CaCl_2 . La transformación se hizo con $10\mu\text{l}$ de ADN plásmidico obtenido por minipreparación (Silhavy, año) y se crecieron en cajas de agar Luria ampicilina ($50\mu\text{g/ml}$).

CEPA/PLASMIDO	CANDIDATOS TRANSFORMADOS
DV2661	NO HUBO
DV2661/pPG110	NO HUBO
DV2661/pPG111	SI HUBO
DV2661/pDH520	SI HUBO
DV2665	NO HUBO
DV2665/pPG110	NO HUBO
DV2665/pPG111	SI HUBO
DV2665/pDH520	SI HUBO

**CUADRO 8-B. ANALISIS DE SUPRESION DEL CODON UGA POR LA DOBLE
MUTANTE *pth(ts)*-SuUGA Δ C1054.**

FAGO	λ_{bar}^+	λ_{bar}^-	$\lambda_{O_{UGA}}$
CEPA			
C600 <i>pth(ts)</i>	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻²
KL2661	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻²
DV2661	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶
KL2665	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁴
DV2665	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶
NK5336	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶	+ 10 ⁻⁶

Este experimento se incubó a 37°C

Los datos estan en u.f.p/ml.

λ 370: $\lambda_{b_{221}}$ cI857 cI::Tn10 O_{UGA}

λ NK1327:Mini Tn 10 kan_R PlacUV5 cI857 P_{am80} *lin5* b522 att'

La ausencia del supresor para P_{30} en la cepa DV2661 se puede explicar pensando que durante la transducción de *pth(ts)* este contransdujo con *tyr R* el cual presenta supresores *supF*.

**CRECIMIENTO DE FAGOS λ bar⁺, λ bar y λ bar⁻ A DIFERENTES TEMPERATURAS
POR LA CEFA *pth*(TS)-*rrsBAC1054* (DV2665).**

En el CUADRO 9-A observamos la inhibición en el crecimiento de los fagos λ bar⁺ y λ bar⁻ a diferentes temperaturas, la mutación *rrsB*-1054 no participa en la disminución en el desarrollo de los fagos aún en presencia de transcritos de *bar*⁺, el efecto inhibitorio observado se debe al defecto en la enzima *pth* y a los transcritos *bar*⁺ (efecto *rap*). La ausencia de crecimiento en las líneas 7 y 8 obedece a letalidad ocasionada por la termosensibilidad de la enzima *Pth*.

CUADRO 9. ENSAYO DE CRECIMIENTO DE FAGOS λ bar⁺

λ bar⁺ y

λ bar⁺ A DIFERENTES TEMPERATURAS POR LA CEPA pth(TS)-
rrsBAC1054 (DV2665).

		32°C			
FAGOS		$\lambda\Delta b_2$	λ bar ⁻	λ bar ⁺	λ bar ⁺
cepa					
1	DV2661	1×10^{10}	5×10^9	7×10^9	6×10^9
2	DV2665	2×10^{10}	5×10^9	7×10^9	5×10^9
3	KL2665	7×10^9	5×10^9	1×10^{10}	3×10^9
		37°C			
4	DV2661	1×10^{10}	6×10^9	1×10^5	3×10^7
5	DV2665	1×10^{10}	5×10^9	1.2×10^5	3×10^7
6	KL2665	1×10^{10}	6×10^9	1.6×10^9	3×10^9
		40°C			
7	DV2661	*	*	*	*
8	DV2665	*	*	*	*
9	KL2665	1×10^{10}	5×10^9	7×10^7	3×10^9

*:no hubo crecimiento del tapiz celular

Los datos estan en u.f.p/ml.

V CONCLUSIONES

El efecto inhibitorio sobre el crecimiento del fago λ por las secuencias bar^+ en cepas rap^- no se observa en cepas silvestres aún cuando la dosis de los transcritos Bar aumenten.

Esto sugiere que el efecto inhibitorio observado en bar^+/rap^- esta intrinsecamente relacionado con el defecto en el gen pth .

La infección de cepas rap^- por fagos λbar^+ , y bar^- revelan que la la viabilidad de rap^- disminuye en un 50% sin importar que fago es el infectante. La mortandad celular no es requisito para la inhibición del crecimiento de los fagos.

Los transcritos bar no influyen sobre el crecimiento de los fagos λbar^+ y λbar^- por la mutante $rrsB$ -(Su UGA- $\Delta C1054$), debido a que no observamos inhibición diferencial en el crecimiento de los fagos, por lo cual no podemos correlacionar la supresión de codones UGA con inhibición en el desarrollo fagico.

La transducción de $pth(ts)$ a la cepa $rrsB$ (SuUGA- $\Delta C1054$), fue posible, la doble mutante obtenida no se pudo transformar con plásmidos portadores de secuencias bar silvestres. Por lo cual no se pudo analizar el crecimiento de fagos en la doble mutante, en presencia de transcritos bar^+ a partir de plásmidos.

En el analisis del crecimiento de fagos bar^+ y bar^- por la doble mutante $rrsB$ (SuUGA- $\Delta C1054$)- $pth(ts)$, la mutación $rrsB$ (SuUGA- $\Delta C1054$) no influye sobre el crecimiento de los fagos λbar^+ y λbar^- . Indicando que $rrsB$ (SuUGA- $\Delta C1054$) no se involucra en la inhibición

del crecimiento de los fagos.

En el analisis de supresión del codón UGA por la doble mutante *rrsB*(SuUGA-ΔC1054)-*pth*(ts) aumenta la supresibilidad del codón UGA en el fago λ370(*O_{UGA}*) por la doble mutante respecto a *pth*(ts) y *rrsB*(SuUGA-ΔC1054) por separado.

REFERENCIAS

- 1.-Ausubel, F.M. and Brent, R. (1991). Current Protocols in Molecular Biology. Volumen I. John Wiley and Sons. New York, U.S.A.
- 2.-Ayala, F.J. y Kiger, J.A.Jr. (1984). Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano. Cd. de México, México.
- 3.-Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Scheffler, K.H. (1992). The Prokaryotes. Second Edition. Volumen III. Springer-Verlag. Berlin, Alemania.
- 4.-Birge, E.A. (1981). Bacterial and Bacteriophage Genetics. Springer-Verlag. Berlin, Alemania.
- 5.-Davis, B. y Dulbecco, R. (1985) Tratado de microbiología. Salvat. Madrid, España.
- 6.-Friedman, D.I., Olson, E. R., Georgopoulo, C., Tilly, Herskowitz, I. and Banuett, F. (1984). Interactions of bacteriophage and hosts macromolecules in the growth of bacteriophage λ . Microbiol. Rev. 48:299-325.

- 7.-García, M.R., De La Vega, F.M., Galindo, J.M., Segura, M. Buckingham, R.H. and Guarneros, G. (1991) Peptidyl-trNA hydrolase in λ inhibition of protein synthesis. EMBO 10 (11).
- 8.-Guarneros, G., Machado, G., Guzmán, P. and Garay, E. (1987). Genetic and physical location of the Escherichia coli rap locus, which is essential for growth of bacteriophage λ . J. Bacteriol. 169:5188-5192.
- 9.-Guzmán, P. and Guarneros, G. (1989). Phage genetics sites involved in λ growth inhibition by the Escherichia coli rap mutant. Genetics 121:401-410.
- 10.-Guzmán, P., Rivera-Chavira, B. E., Court, D.L., Gottesman, M.E. and Guarneros, G. (1990). Transcription of a bacteriophage λ DNA site block growth of Escherichia coli. J. Bacteriol. 172:1030-1034.
- 11.-Henderson, D. and Weil, J. (1976). A mutant of Escherichia coli that prevents growth of phage λ and is bypassed by λ mutants in nonessential region of the genome. Virology 71: 546-559.
- 12.-Hendrix, R.W., Roberts, J.W., Stahl, F.W. Weisberg, R.A. (1983). LAMBDA II. Cold Spring Harbor Laboratory. New York., U.S.A.

13.-Menninger, J.R. (1978). The accumulation as peptidyl-transfer RNA of isoaccepting transfer RNA families in Escherichia coli with temperature-sensitive peptidyl-transfer RNA hydrolase. J. Biol. Chem. 253:6808-6813.

14.-Menninger, J.R., Walker, C. and Tan, P. F. (1973). Studies on the metabolic role of peptidyl-tRNA hydrolase. Mol. Gen. Genet. 121:307-324.

15.-Murgola, E.J., Hijazi, K.A., Goring, H.V., and Dahlberg, A.E. (1988) Mutant 16S ribosomal RNA: a codon-specific translational suppression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4162-4165.

16.-Murgola, E.J., and Yanofsky, C. 1974. Selection for new aminoacids at position 211 of the tryptophan synthetase chain of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 86:775-784.

17.-Murgola, E.J., and Jones, C.I. 1978. A novel method of detection and characterization of ochre suppressors in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 159: 179-184.

18.-Pérez-Morga, D. and Guarneros, G. (1990). A short DNA sequence from λ phage inhibits protein synthesis in Escherichia coli rap. J. Mol. Biol. 216:243-250.

GLOSARIO

bar: Región de ADN del fago lambda que al ser transcrito en cepas rap inhiben el crecimiento del fago. Sus siglas significan "Blanco de acción de rap"

CODON: Grupo de tres nucleótidos adyacentes de moléculas de ARN que codifican para un aminoácido específico en la síntesis de proteínas.

COTRANSDUCCION: Frecuencia con la que se transducen dos o más genes cercanos entre sí.

GENOMA: Contenido genético de una célula o virus, el cual codifica para todas las estructuras y funciones de la célula o virus.

MUTACION: Cambios hereditarios en la secuencia de nucleótidos que se producen en un organismo. Pueden ser espontáneos o inducidos por agentes mutágenos.

MUTANTE SUPRESORA: Mutante que elimina el efecto fenotípico de otra mutación, pero no el efecto genotípico, puede localizarse dentro del mismo gen o en un gen diferente a la mutación original.

PLASMIDO: Elemento genético extracromosomal situado dentro de la célula anfitriona, que se replica independientemente del cromosoma.

PROMOTOR: En el ADN de un operón, secuencia de nucleótidos que es reconocida por la ARN transcriptasa como un sitio en el cual se inicia la transcripción.

pL: Promotor izquierdo del fago lambda.

pR: Promotor derecho del fago lambda.

pth: Gen que codifica para la enzima Pth a la que se le ha atribuido el papel de hidrolizar los peptidil-t-RNA durante la

terminación de la traducción.

rab: Cepa E. coli mutada en el gen pth.

rrsB: Región del ADN bacteriano que codifica para el ARN ribosomal 16S.

SuUGA: Mutación supresora de codones UGA.

TRANSCRIPCION: Transferencia de la información genética codificada en la secuencia de nucleótidos del ADN a una secuencia de nucleótidos de una molécula de ARN.

TRANSDUCCION: Es la transferencia de ADN de una célula a otra mediante un bacteriófago.

TRANSFORMACION: Es la asimilación directa del ADN exógeno por una célula, que lleva a la recombinación entre este ADN y el ADN celular.

VIABILIDAD POST-INFECCION; el número de células que crecen posterior a la infección, entre el número de células totales no infectadas.

CENTROS INFECTIVOS: Número de células infectadas capaces de producir fagos.

FAGO PRODUCIDO POR CELULA: Fago total producido entre centros infectivos.

PORCIENTO DE CELULAS INFECTADAS: Centros infectivos sobre el número de células totales por 100.

PORCIENTO DE VIABILIDAD: número de células post-infección entre el número de células totales por 100.

PORCIENTO DE FAGO ADSORBIDO: (fago total menos fago en el sobrenadante) entre fago total por 100.