

22
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN
MUTANTES DE *Escherichia coli*, DEFECTIVAS EN
PEPTIDIL-tRNA-HIDROLASA (Pth).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MATILDE GARCIA ESPITIA

ASESORES: DR. GABRIEL GUARNEROS PERA

DR. JAVIER HERNANDEZ SANCHEZ O.F.I. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

199



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: Inhibición de la síntesis de proteínas en mutantes de Escherichia coli, defectivas en peptidil-tRNA-hidrolasa (Pth).

que presenta la pasante: García Espitia Matilde
con número de cuenta: 8854953-6 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de Octubre de 1996

PRESIDENTE	<u>R.F.I. Andrea Becerril Osanoya</u>
VOCAL	<u>M. en C. Sofia González Gallardo</u>
SECRETARIO	<u>M. en C. Andrés Romero Rojas</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>

[Handwritten signatures and initials over the printed names]

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el Departamento de Genética y Biología Molecular, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría del Dr. Gabriel Guarneros Peña y del Dr. Javier Hernández Sánchez.

AGRADECIMIENTOS :

Al Dr. Gabriel Guarneros Peña:

Por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Jaime García Mena:

Por todos sus comentarios, consejos y sugerencias para la realización de este trabajo.

A todos aquellos **AMIGOS Y COMPAÑEROS** que, en al menos un momento, me han mostrado su amistad y apoyo, compartiendo momentos inolvidables de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por brindarme la oportunidad de superarme día a día.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI):

Por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA :

A mis padres Esperanza y Guillermo:

A quienes debo eterno agradecimiento, por haberme dado la vida y la oportunidad de superarme; por sus sacrificios y por su cariño y apoyo constante e incondicional que he recibido y seguiré recibiendo.

A mis hermanos Mario, Eleazar, María, Javier, Martha e Isabel:

Por todos los momentos inolvidables que hemos compartido.

A mis sobrinos Uriel e Ivan:

Por el cariño que siempre me han proporcionado.

A mi gran amigo Jaime:

Por su amistad sincera y apoyo brindado, por ayudarme a conquistar mis metas. ¡Muchísimas gracias!

INDICE GENERAL

	Pág.
Indice general	i
Indice de abreviaturas	iv
Indice de figuras	vi
Indice de tablas	vii
Indice de cuadros	vii
CAPITULO I.	
RESUMEN	1
CAPITULO II.	
INTRODUCCION	
2.1. El bacteriófago lambda	3
2.2. La síntesis de proteínas	7
2.3. Síntesis de proteínas e infección viral	12
2.4. Secuencias bar del fago lambda	13
2.5. La mutación pth(rap) de <i>Escherichia coli</i>	15
CAPITULO III.	
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	
3.1. Hipótesis	17
3.2. Objetivo General	17
3.3. Objetivos Específicos	17
CAPITULO IV.	
MATERIALES Y METODOS	
4.1. Cepas	18
4.2. Medios de cultivo y reguladores	18
4.3. Condiciones de cultivo	19
4.4. Preparación de células competentes	20
4.5. Transformación	20
4.6. Prueba de exclusión de Fagos	22
4.7. Cinética de Crecimiento	22

	Pág.
4.8. Marcaje Metabólico	22
4.9. Cuantificación de proteínas	23
4.10. Precipitación con TCA	25
4.11. Electroforesis Bidimensional	25
a) Isoelectroenfoque (IEF)	26
b) Electroforesis SDS	27
4.12. Detección de proteínas en geles	27

CAPITULO V.

RESULTADOS

5.1. La sobre expresión de <i>bart</i> afecta el crecimiento de la cepa <i>rap</i>	28
5.2. La disminución de la velocidad de crecimiento por acción de <i>bart</i> , correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas	32
5.3. La naturaleza de las proteínas inhibidas por <i>bart</i> en <i>E. coli</i> es muy diversa	34
a) Proteínas afectadas en la cepa <i>N5960rap/pFGGbart</i> a 43°C	34
b) Proteínas afectadas en la cepa <i>N5960rap/pFGG93</i>	36
c) Proteínas afectadas en la cepa <i>N5960/pFGG93</i>	36
5.4. Efecto de la ausencia de actividad de la enzima <i>Pth</i> , sobre la síntesis de proteínas	39
a) Proteínas afectadas en <i>C600pth^{ts}</i> a 43°C	39
b) Proteínas afectadas en <i>C600 silvestre</i>	41

CAPITULO VI.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

6.1. La transcripción de <i>bar</i> y la baja concentración de la enzima <i>pth(ts)</i> a 43°C afecta la viabilidad celular	43
6.2. <i>bar</i> ⁺ , disminuye la síntesis de proteínas en cepas <i>rap</i>	43
6.3. La síntesis de ciertas proteínas disminuye por incremento de la temperatura en la cepa <i>N5960rap/pFGG93</i>	44
6.4. La síntesis de proteínas disminuye por incremento de la temperatura en la cepa <i>N5960/pFGG93</i>	44
6.5. La baja actividad de la enzima <i>Pth</i> disminuye la síntesis de proteínas	45
6.6. La síntesis de ciertas proteínas disminuye por incremento de la temperatura en la cepa <i>C600</i>	45

CAPITULO VII.

CONCLUSIONES	48
--------------------	----

CAPITULO VII.

REFERENCIAS	50
-------------------	----

INDICE DE ABREVIATURAS

%I	Porcentaje de incorporación
bar	Blanco de acción de rap
Ci/mmol	Curies por milimol
cpm	Cuentas por minuto
CTP	Cuentas totales de la pastilla
CTS	Cuentas totales del sobrenadante
DNA	Acido desoxiribonucleico
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
IFE	Isoelectroenfoque
kDa	Kilodaltones
M	Molar
mA	Miliampers
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetros
MP	Material TCA precipitable
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
nm	Nanomolar
NP-40	Nonidet P-40

O.D.	Densidad óptica
pb	Pares de bases
pL	Promotor izquierdo
Pth	Peptidil-tRNA-hidrolasa
pth ^{ts}	Peptidil-tRNA-hidrolasa termosensible
rap	Restricts att ⁺ phage
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Acido tricloro acético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
V	Volts
µg	Microgramos
µg/ml	Microgramos por mililitro

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Mapa genético del bacteriófago lambda	5
<i>Figura 2.</i> Etapas de la formación del complejo de iniciación 70S	9
<i>Figura 3.</i> Construcción de los plásmidos <i>pFGG93</i> y <i>pFGGbar⁺</i>	29
<i>Figura 4.</i> Cinética de viabilidad de células <i>N5960rap/pFGGbar⁺</i> crecidas a 32 y 43°C	30
<i>Figura 5.</i> Cinética de viabilidad de células <i>N5969rap/pFGG93</i> crecidas a 32 y 43°C	31
<i>Figura 6.</i> <i>N5960rap/pFGGbar⁺</i> . Proteínas afectadas por inducción de <i>bar</i> en un fondo genético <i>rap</i>	35
<i>Figura 7.</i> <i>N5960rap/pFGG93</i> . Proteínas afectadas por incremento de temperatura en un fondo genético <i>rap</i>	37
<i>Figura 8.</i> <i>N5960/pFGG93</i> . Proteínas afectadas por incremento de temperatura en un fondo genético silvestre	38
<i>Figura 9.</i> <i>C600pth^{ts}</i> . Proteínas afectadas por inactivación de <i>Pth</i> por incremento de temperatura	40
<i>Figura 10.</i> <i>C600</i> . Proteínas afectadas por incremento de temperatura en un fondo genético silvestre	42

INDICE DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
<i>Tabla 1.</i> Porcentaje de incorporación de [³⁵ S]-Metionina	33
<i>Tabla 2.</i> Proteínas que sufren cambios en dos cepas diferentes	47

INDICE DE CUADROS

	<i>Pág.</i>
<i>Cuadro 1.</i> Diagrama de flujo para la transformación de la cepa <i>N5960rap</i>	21
<i>Cuadro 2.</i> Diagrama de flujo para la detección de proteínas	24

CAPITULO I

RESUMEN

La mutación *rap* está localizada en el gen *pth* que codifica para la peptidil-tRNA-hidrolasa (Pth), la cual es una enzima esencial para la síntesis de proteínas en la bacteria *Escherichia coli*. El crecimiento del fago lambda es inhibido por la mutación *rap*, existen mutaciones en el fago que compensan dicha inhibición, las cuales se encuentran en las regiones denominadas *bar*. Las regiones *bar* contenidas en plásmidos multicopia son capaces de inhibir la síntesis proteica en las mutantes *rap*. Existe otra mutación en el gen llamada *pth(ts)* que determina un fenotipo termosensible. Esta mutación a 42°C causa una baja considerable de la concentración de la proteína Pth mutante, provocando un bloqueo en la síntesis de proteínas y una rápida muerte celular.

En el presente trabajo se trató de determinar si la inhibición de la síntesis de proteínas al expresar la región *bar* en cepas mutantes *pth(rap)*, presenta el mismo efecto al observado por inhibición de la actividad de cepas *pth(ts)* a 42°C, basándonos en la hipótesis de que la expresión de *bar*, inhibe la síntesis de proteínas por titulación de la actividad de Pth en la célula.

Para ello, se realizaron cinéticas de crecimiento de la cepa N5960*rap/pFGGbar⁺*, en donde el promotor pL se activa a 43°C permitiendo la inducción de la transcripción de *bar*. Observamos que a los 30 minutos las células comienzan a morir y a los 90 minutos hay 12% de bacterias viables se consideró que éste sería el tiempo óptimo para observar el efecto de *bar* sobre la síntesis de proteínas en la cepa *pth(rap)*. Una vez establecido el tiempo de inducción, se realizó marcaje metabólico con [³⁵S]-Metionina, se marcaron las proteínas que se sintetizaron durante 10 minutos después de los 90 minutos de transcripción de *bar*, obteniéndose un porcentaje bajo de

incorporación. Una vez obtenidas las muestras marcadas con [³⁵S]-Metionina, las proteínas se resolvieron y revelaron por autoradiografías en geles bidimensionales, en donde se puede observar las proteínas afectadas por la transcripción de *bar*. Una vez establecidas las condiciones de incubación y de marcaje, se procedió a hacer lo mismo con las cepas N5960rap/pFGG93, N5960/pFGG93, C600 y C600pth^{ts}.

Los resultados muestran que la transcripción de *bar* en la cepa rap y la baja concentración de la enzima Pth en la cepa pth(ts), provocan disminución general de la síntesis de proteínas de características muy parecidas.

CAPITULO II

INTRODUCCION

El estudio de las interacciones entre el bacteriófago lambda y su huésped *Escherichia coli* han revelado fenómenos fundamentales de interés general en el campo de la biología. El análisis de mutantes bacterianas que interfieren con el desarrollo del bacteriófago han sido herramientas básicas en el entendimiento de estos fenómenos (ver Arber, 1983).

2.1. El bacteriófago lambda.

Lambda es un virus que se multiplica en la bacteria *Escherichia coli*, que fue aislado por Lederberg (1951); está constituido por una cabeza icosaédrica de cerca de 50 nm de diámetro y una cola tubular de 150 nm de largo (Lewin B., 1977). Cada partícula madura tiene cantidades aproximadamente iguales de proteína y DNA (Hershey y Dove, 1971). La molécula de DNA es de doble cadena con un peso molecular de 31×10^6 daltones, cerca de 48,500 pb (Daniels et al., 1983; Fiantt et al., 1977; Vollenweider et al., 1978).

El desarrollo de lambda se inicia cuando una partícula se adsorbe por el extremo de su cola a los receptores de la célula huésped, *Escherichia coli*, a la cual inyecta la molécula de DNA que codifica aproximadamente para 50 proteínas (Emr et al., 1978). La infección por lambda resulta de una expresión secuencial de genes que está determinada por la síntesis consecutiva de proteínas regulatorias. El mapa de lambda incluye agrupamientos de genes que codifican para funciones relacionadas: Los genes A, W, B, C, Nu3, D, E, FI y FII codifican para las proteínas estructurales de la cabeza (Weigle, 1966) Z, U, V, G, T, H, M, L, K, I y J son los genes de las proteínas estructurales de la cola (Parkinson, 1968), int, xis, red α , β y τ , son necesarios para las funciones de recombinación (Guarneros y Echols,

1970); cIII, N, Q, cI, cro y cII están involucrados en diferentes mecanismos regulatorios (Court y Sato, 1969); O y P en la replicación del DNA (Brooks, 1965; Joyner et al., 1966) y S y R en la lisis celular (Herskowitz y Hagen, 1980; Harris, et al., 1967). Esto permite que durante el desarrollo del fago, los genes que son necesarios puedan ser expresados coordinadamente a través de controles transcripcionales, como se observa en la figura 1.

El primer paso en la infección del bacteriófago lambda es su adsorción a la célula huésped. Esta adsorción involucra una interacción específica entre el extremo de la cola del bacteriófago (proteína J) y su receptor el producto del gene bacteriano *lamB* (Murialdo y Siminovitch, 1972). La proteína *lamB* es requerida por el transporte de maltosa y su expresión es inducida por ésta.

En la partícula viral, el genoma del bacteriófago lambda se encuentra como una molécula lineal de DNA de doble cadena. Inmediatamente después de la inyección en la célula huésped, la molécula de DNA se circulariza, debido a la presencia de 12 bases complementarias de los sitios *cos* en sus extremos (Yarmolinsky, 1971).

Luego de la infección lambda como todo fago temperado puede seguir para su desarrollo por cualquiera de dos vías, la lítica o la lisogénica (Herskowitz, 1973). Durante la ruta lítica se forma una progenie de aproximadamente 100 fagos por cada bacteria infectada. Una vez que el cromosoma del virus es replicado varias veces y empaquetado dentro de la envoltura viral, los fagos se liberan, conduciendo al huésped a la lisis y muerte celular (Weisber et al., 1977).

En la vía lisogénica el huésped sobrevive y el DNA del fago se integra en el cromosoma de la bacteria recibiendo el nombre de profago (Echols H., 1972), a la cepa bacteriana que lo lleva se le denomina lisógena, ésta al replicarse transmite el carácter lisogénico a su descendencia, ya que las funciones de replicación

Figura 1. Mapa del genoma del bacteriófago lambda.

Los extremos del mapa corresponden a los extremos cohesivos (sitio cos) en el DNA del bacteriófago; se señala la escala en kilo pares de bases (kb). Los grupos de genes con funciones relacionadas están agrupados bajo los corchetes y los genes regulatorios N (regulación temprana) y Q (regulación tardía) están indicados por las líneas verticales. Los promotores conocidos se denotan con la letra P y con un subíndice que indica el punto de origen. (P_I) promotor del gen *i_{OL}*, (P_E) promotor para el establecimiento del represor *cI*, (P_M) promotor para el mantenimiento del represor *cI*, (P_L) promotor mayor izquierdo, (P_R) promotor mayor derecho, (P_O) promotor de oop, (P_R') promotor tardío. (—>) dirección y extensión de la transcripción. Las áreas mayores de mutaciones por delección o por sustitución están indicadas por debajo de la escala. (aII) sitio de integración, (ori) origen de replicación.

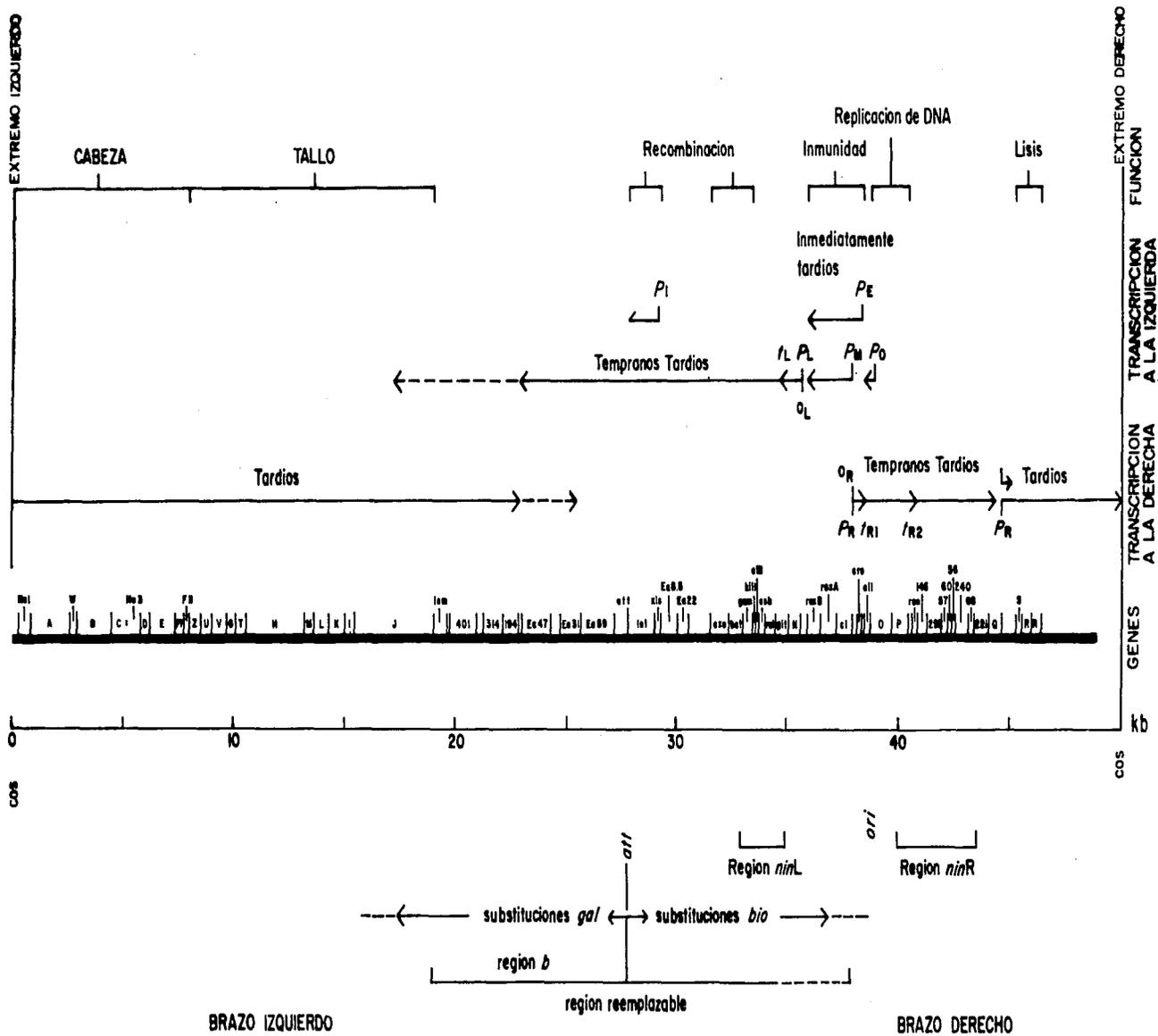


FIG. 1

propias del fago quedan reprimidas. Un profago inicia el crecimiento lítico cuando la represión se suprime, este proceso llamado inducción consiste en la escisión del profago seguida de la expresión de su DNA para generar una progenie de partículas infecciosas de manera similar a la vía lítica.

La elección de una de estas 2 respuestas es influenciada por la temperatura, la multiplicidad de infección, el estado general de la bacteria, el genotipo del fago y el del huésped.

2.2. La síntesis de proteínas.

La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares más complejos que requiere de la participación de: el RNA mensajero, los ribosomas, los aminoacil-tRNA y varios factores proteicos de traducción. Para el inicio de la traducción, es necesaria la presencia de señales en el mRNA, como el codón de iniciación que normalmente es AUG y la secuencia Shine-Dalgarno, que es complementaria con el extremo 3' de RNA ribosomal 16S de la subunidad menor del ribosoma (Shine y Dalgarno, 1974; Jacob, y col., 1987).

Para la iniciación de la síntesis de proteínas es necesario que el tRNA esté alineado de tal forma que la síntesis comience en el codón correcto. Esto se logra mediante un complejo de iniciación 70S, que consta de la subunidad 30S, la subunidad 50S, el mRNA y un metionil-tRNA correcto, denominado tRNA iniciador ($tRNA_{Met}$). El tRNA iniciador se utiliza exclusivamente en la iniciación de la síntesis proteica. La formación del complejo de iniciación depende de la acción de tres factores de iniciación, denominados IF-1, IF-2 e IF-3. El primer factor que actúa es el IF-3, tiene la función de promover la disociación del ribosoma 70S en sus dos subunidades. El IF-3 se une a la subunidad 30S y, aparentemente, cambia la conformación de la subunidad, de tal forma que ésta ya no se puede asociar con la subunidad 50S.

Los factores IF-1 e IF-2, también se unen a la subunidad 30S. El IF-2, que contiene un sitio de unión para GTP, es capaz de distinguir el tRNA_{fMet} de entre todas las otras moléculas de tRNA de la célula. Para que se una el tRNA_{fMet} al IF-2 es necesario que se forme el complejo IF-2:GTP. El IF-1 facilita la acción de los factores IF-2 e IF-3.

La subunidad 30S, junto con los otros factores de iniciación que están unidos a ella, es capaz de unir tanto el mRNA como el fMet-tRNA_{fMet}. Una vez que están unidos el mRNA y el fMet-tRNA_{fMet} se disocia el IF-3, completándose así la formación del complejo de iniciación 30S. A continuación la subunidad 50S se une al complejo de iniciación 30S, formándose un complejo de iniciación 70S activo en el cual el mRNA y el fMet-tRNA_{fMet} están unidos al ribosoma.

Cuando se forma el complejo de iniciación 70S se hidroliza el GTP, se libera P_i y el IF-2:GTP y el IF-1 se disocian del complejo. El GDP se disocia del IF-2, de forma que el IF-2 está en disposición de unirse a otra molécula de GTP. Y el fMet-tRNA_{fMet} se ubica en el sitio P del ribosoma, en donde puede reaccionar con el aminoacil-tRNA que ingresa, codificado por el segundo codón del mRNA en el sitio ribosomal A (Kozak, 1983).

Durante la fase de alargamiento de la cadena peptídica, se requiere del factor EF-Tu que lleva unido GTP. EF-Tu-GTP se une al aminoacil-tRNA para llevarlo al sitio A del ribosoma, el cual tiene unido el peptidil-tRNA en el sitio P. La liberación de EF-Tu del sitio A involucra la hidrólisis del GTP que está acoplada a la formación del enlace peptídico y que además requiere de la actividad de peptidil transferasa localizada en la subunidad ribosomal 70S. Para el funcionamiento del factor EF-Tu, se requiere del factor de alargamiento EF-Ts, que regenera la forma activa de EF-Tu, reemplazando al GDP por GTP.

La fase final de un ciclo de alargamiento involucra la translocación del ribosoma que avanza 3 nucleótidos sobre el mRNA dando como resultado la expulsión del tRNA no cargado del sitio P para reemplazarlo por el peptidil-tRNA que está siendo sintetizado. La

Figura 2. Etapas de la formación del complejo de iniciación 70S.

(1) El IF-3, asistido por el IF-1, se une a la subunidad 30S y promueve la disociación del ribosoma 70S en sus subunidades. (2) El IF-2:GTP se une a la subunidad 30S y facilita la unión del fMet-tRNA^{fMet}; el mRNA también se une a la subunidad 30S. Una vez unidos el fMet-tRNA^{fMet} y el mRNA se disocia el IF-3, completándose la formación del complejo de iniciación 30S. (3) Una subunidad 50S se une al complejo de iniciación 30S, se hidroliza el GTP, se libera el P_i y el IF-2:GTP y el IF-1 se disocian, formándose un complejo de iniciación 70S activo. Posteriormente, el GDP se disocia del IF-2, que puede así unir de nuevo otra molécula de GTP.

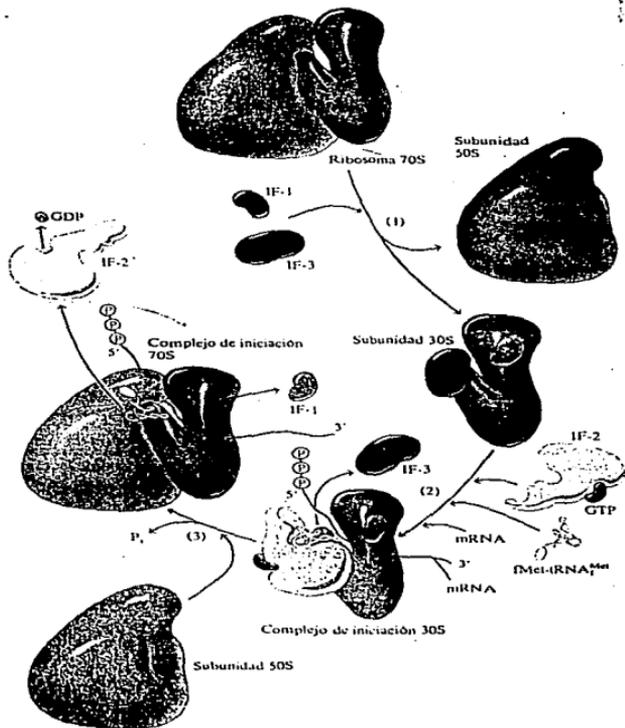


Figura 2

Los factores IF-1 e IF-2, también se unen a la subunidad 30S. El IF-2, que contiene un sitio de unión para GTP, es capaz de distinguir el tRNA_{fMet} de entre todas las otras moléculas de tRNA de la célula. Para que se una el tRNA_{fMet} al IF-2 es necesario que se forme el complejo IF-2:GTP. El IF-1 facilita la acción de los factores IF-2 e IF-3.

La subunidad 30S, junto con los otros factores de iniciación que están unidos a ella, es capaz de unir tanto el mRNA como el fMet-tRNA_{fMet}. Una vez que están unidos el mRNA y el fMet-tRNA_{fMet} se disocia el IF-3, completándose así la formación del complejo de iniciación 30S. A continuación la subunidad 50S se une al complejo de iniciación 30S, formándose un complejo de iniciación 70S activo en el cual el mRNA y el fMet-tRNA_{fMet} están unidos al ribosoma. Cuando se forma el complejo de iniciación 70S se hidroliza el GTP, se libera P_i y el IF-2:GTP y el IF-1 se disocian del complejo. El GDP se disocia del IF-2, de forma que el IF-2 está en disposición de unirse a otra molécula de GTP. Y el fMet-tRNA_{fMet} se ubica en el sitio P del ribosoma, en donde puede reaccionar con el aminoacil-tRNA que ingresa, codificado por el segundo codón del mRNA en el sitio ribosomal A (Kozak, 1983).

Durante la fase de alargamiento de la cadena peptídica, se requiere del factor EF-Tu que lleva unido GTP. EF-Tu-GTP se une al aminoacil-tRNA para llevarlo al sitio A del ribosoma, el cual tiene unido el peptidil-tRNA en el sitio P. La liberación de EF-Tu del sitio A involucra la hidrólisis del GTP que está acoplada a la formación del enlace peptídico y que además requiere de la actividad de peptidil transferasa localizada en la subunidad ribosomal 70S. Para el funcionamiento del factor EF-Tu, se requiere del factor de alargamiento EF-Ts, que regenera la forma activa de EF-Tu, reemplazando al GDP por GTP.

La fase final de un ciclo de alargamiento involucra la translocación del ribosoma que avanza 3 nucleótidos sobre el mRNA dando como resultado la expulsión del tRNA no cargado del sitio P para reemplazarlo por el peptidil-tRNA que está siendo sintetizado. La

translocación del ribosoma se lleva a cabo por el factor EF-G-GTP e implica la hidrólisis de GTP catalizada por el ribosoma (Lewin, 1990).

El evento de terminación de la síntesis de proteínas, ocurre cuando el codón que entra al sitio A del ribosoma es uno de los tres tripletes UAA, UAG o UGA. El reconocimiento de los codones de terminación no es mediado por moléculas de tRNA, sino que son reconocidos directamente por factores de terminación. En *E. coli* se han descrito 2 factores de terminación, RF1 (Caskey y col., 1969) que reconoce a los codones UAA y UAG, y RF2 (Capecchi y Klein, 1969) que reconoce los codones UGA y UAA (Craigen y Caskey, 1987). Para la terminación de la síntesis de proteínas, se requiere la hidrólisis del polipéptido del peptidil-tRNA, localizado en el sitio P, la expulsión del tRNA final no cargado, la liberación del mRNA y el desensamblaje de las subunidades del ribosoma.

2.3. Síntesis de proteínas e infección viral.

Durante la infección los virus compiten con la célula huésped por la maquinaria de síntesis de macromoléculas. La síntesis de proteínas es uno de los mecanismos que los virus alteran para favorecer la síntesis de sus propias proteínas. En los virus animales se han descrito diversos mecanismos mediante los cuales se abate la traducción de la célula huésped. Entre estos mecanismos se tienen la degradación de mRNA celulares, la inactivación de factores de traducción, la producción de factores que específicamente inhiben la traducción celular o facilitan la traducción viral. Otros mecanismos incluyen el aumento en la síntesis de mRNA vírales que por cantidad compiten por la maquinaria traduccional y cambios en el ambiente iónico intracelular que favorecen la traducción de mensajeros vírales (Schneider, 1987). A pesar de que los virus de bacterias o bacteriófagos han sido ampliamente estudiados, poco se sabe acerca de cómo pueden apropiarse de la maquinaria de síntesis de proteínas de sus hospederos. En el caso del fago T4, se ha descrito la presencia de 8 nuevas especies de tRNA sintetizados por el fago, que optimizan la síntesis de sus proteínas, aunque los genes que

codifican dichos tRNA no son esenciales para su desarrollo (Wilson y col., 1972).

En el caso del bacteriófago lambda, se sabe que durante la infección, existe inhibición de la síntesis de proteínas del huésped, mientras que las proteínas del fago se sintetizan preferencialmente. El mecanismo de esta inhibición, es algo que se desconoce. Existen reportes que sugieren que la expresión de la región del genoma del fago, entre los genes *exo* y *bet*, es importante para producir inhibición en la síntesis de proteínas, RNA y DNA del huésped (Cohen y Chang, 1970). El estudio de mutantes de *Escherichia coli* resistentes al crecimiento del fago lambda, ha resultado en un mejor entendimiento de los sistemas de replicación del DNA, terminación de la transcripción, antiterminación y recombinación (Friedman y col., 1984).

2.4. Secuencias *bar* del fago lambda.

La mutante rap de *Escherichia coli* impide el crecimiento del fago lambda silvestre (Henderson y Weil, 1976; Guarneros y col., 1987). El aislamiento de mutantes del fago capaces de crecer sobre cepas rap y la ubicación de estos mutantes definen 3 regiones en el genoma del fago denominadas *bar* (por blanco de acción de rap). Las regiones descritas son: *barI* que se ubica sobre el sitio *attP*, *barII* localizada en la región *cIII-ssb* y *barIII* en la región de inmunidad (Guzmán y Guarneros, 1989). Una mutación en cualquiera de estas regiones permite al fago crecer en cepas rap.

La evidencia directa de la inhibición mediada por secuencias *bar*, se obtuvo al construir plásmidos en donde se clonó un fragmento de 130 pb que contienen a la región *barI* bajo la transcripción iniciada en un promotor activo ya sea *pgal* o *pL*. Con el sistema de plásmidos se pudo ver que sólo cuando hay transcripción de la secuencia *bar* silvestre se observa el efecto letal, la transcripción de la secuencia con la mutación puntual *bar101* o la transcripción de la región

silvestre en sentido contrario al que ocurre in vivo en el fago, no tiene ningún efecto letal (Guzmán y col., 1990). El hecho de que se pueda reproducir en plásmidos el efecto inhibitorio de *bar* demuestra que no se requiere de la participación de otras funciones del fago para provocar la letalidad.

En la región *barI* se ha localizado una secuencia de repetidos invertidos, esta secuencia también está presente en la región *barII* en donde se encuentra un repetido invertido casi idéntico (12 de las 14 pb son iguales) se sabe que el repetido no es el único elemento que participa en el fenómeno, ya que por reconstrucción de la región *barI* con oligonucleótidos sintéticos, se encontró que una secuencia de 21 pares de bases (5'-TATATTGATATTTATATCATT-3') impide el mantenimiento de plásmidos en cepas rap (Guzmán y col., 1990).

La transcripción descontrolada de la secuencia *bar* es letal para *Escherichia coli* rap (Guzmán y col., 1990). Al estudiar el mecanismo de la letalidad mediada por secuencias *bar* presentes en plásmidos, Pérez-Morga y Guarneros (1990) reportaron que durante la transcripción de secuencias *bar* silvestres en una bacteria rap, el RNABar tiene una vida media 3.5 veces mayor que en condiciones rap⁺, además, se presenta una inhibición de la expresión de los genes contenidos en los plásmidos *bar* aunque el RNA mensajero ésta presente. Y se observa también, una inhibición general de la síntesis de proteínas de la bacteria medida como incorporación de [³⁵S]-Metionina posterior a la inducción de transcripción de *bar*, así como, en la obtención de un patrón bidimensional de proteínas alterado. En base a esto se ha propuesto que la transcripción a través de las regiones *bar* o la acumulación del RNABar provoque una inhibición generalizada en la síntesis de proteínas de la bacteria que culminaría en la muerte celular (Pérez-Morga y Guarneros, 1990). Se ha propuesto que los transcritos de *bar* de alguna manera inhiban o depleten una función bacteriana limitante en la mutante rap y que esta función pudiera ser la peptidil-tRNA hidrolasa, una enzima involucrada en la síntesis de proteínas (Guzmán y col., 1990; Pérez-Morga y Guarneros, 1990).

2.5. La mutación *pth(rap)* de *Escherichia coli*.

La mutación *rap* de *Escherichia coli*, ha sido localizada mediante mapeo por transducción con el fago P1, se localizó en el minuto 26 del cromosoma bacteriano y es una mutación en el gene *pth* que codifica para la enzima peptidil-tRNA hidrolasa (Pth) una enzima esencial para *Escherichia coli* (Pérez-Morga y Guarneros, 1990; Guarneros y col., 1987). El mapeo funcional del gen *rap* mediante deleciones generadas *in vitro* reveló que siempre que se afecta la función *Rap* también se afecta la función *Pth*.

Un hecho que llama la atención es la similitud que existe entre la muerte bacteriana inducida por la transcripción de plásmidos *bart*⁺ (Pérez-Morga y Guarneros, 1990) y la muerte de la mutante *pth*^{ts} descrita por Atherly y Menninger (1972). Cuando un cultivo de la mutante *pth*^{ts} creciendo en fase exponencial se incubaba a 43°C, se observa que la síntesis de proteínas cesa entre los 6 y 8 minutos, sin embargo, la síntesis del RNA y DNA no se afectan, esto sugiere que la deficiencia funcional de la mutante es a nivel traduccional, sin embargo, se han medido *in vitro* las fases de iniciación, elongación y terminación de la traducción en extractos de las mutantes termosensibles sin encontrar alguna deficiencia funcional evidente más que en la actividad de la peptidil-tRNA hidrolasa lo que sugiere que es una función esencial para la bacteria (Atherly y Menninger, 1972; Menninger y col., 1973).

La enzima peptidil-tRNA hidrolasa es una hidrolasa específica que corta la unión éster entre el tRNA y residuos aminoacil N-sustituídos ya sea N-acetil o polipeptidil-tRNA (Cuzin y col., 1967), es incapaz de hidrolizar al N-formilmethionil-tRNA_m^{Met} aunque reconoce al N-acetilmethionil-tRNA_m^{Met} (Kössel y RajBhandary, 1968). Se han propuesto dos funciones para la enzima la primera es que la peptidil-tRNA hidrolasa fuera la responsable de la liberación de proteínas maduras durante el proceso normal de terminación de la traducción, o bien, que fuera la encargada de recuperar los tRNA de las moléculas de polipeptidil-tRNA generados por eventos erróneos

durante la síntesis de proteínas, la eliminación de los peptidil-tRNAs impediría que compitieran con los N-formilmetionil-tRNA_f durante la iniciación de la traducción (Cuzin y col., 1967; Kössel y RajBhandary, 1968).

Se han aislado mutantes de *Escherichia coli* defectuosas en peptidil-tRNA hidrolasa (Pth), que son resistentes a la infección por el colifago silvestre lambda (García-Villegas y col., 1991, Henderson y Weil, 1976). La enzima peptidil-tRNA hidrolasa (Pth) degrada moléculas de peptidil-tRNA a péptidos y tRNAs. Se ha sugerido que los sustratos naturales de la enzima podrían ser los peptidil-tRNAs que se han separado prematuramente de los ribosomas. 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 acumulación de peptidil-tRNA bloqueo de la síntesis proteica y en una rápida muerte celular (Menninger, 1978).

A la fecha se desconoce el mecanismo por el cual la ausencia de la función Pth provoca la muerte bacteriana. Por medio de experimentos genéticos realizados con la mutación *pth^{ts}*, se determinó que esta mutación suprime la terminación de la traducción mediada por cualquiera de los 3 codones de terminación UGA, UAA y UAG. Estos resultados sugieren que la enzima Pth está involucrada en el proceso de terminación de la traducción en *Escherichia coli* (García-Villegas, 1991). Se ha propuesto además que la enzima Pth participa en la terminación de la traducción no excluyendo que tenga la función de hidrólisis de peptidil-tRNAs en la célula, de hecho en ensayos de actividad de la mutante *pth^{ts}* a temperaturas restrictivas no se observa actividad de peptidil-tRNA hidrolasa (Atherly y Menninger, 1972) sugiriendo que es la única enzima de *Escherichia coli* con esta actividad indispensable para la bacteria.

CAPITULO III

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis.

La expresión de *bar* inhibe la síntesis de proteínas por titulación de la actividad de Pth en la célula.

3.2. Objetivo General.

Determinar si la inhibición de la síntesis de proteínas por ausencia de Pth es o no igual a la causada por la expresión de los sitios *bar* del fago lambda.

3.3. Objetivos Específicos.

Determinar el efecto de la inducción de *bar* en mutantes *pth(rap)* y el efecto de la reducción de la actividad de Pth por incremento de la temperatura, en células *pth(ts)* sobre el crecimiento celular.

Analizar la síntesis de proteínas en las células *pth(rap)* durante la expresión de *bar* y en las células *pth(ts)* a 43°C mediante marcaje metabólico con [³⁵S]-Metionina y electroforesis bidimensional.

CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS

4.1. Cepas.

Se emplearon las cepas: C600 (thr1 leuB6 thi1 lacY1 sup E44 tonA21); C600 *pth*^{ts} obtenida por cotransducción con P1*vir* de *pth*^{ts} con *zch*: :Tn10 a partir de la cepa H0300 (Hove-Jensen, 1985). N5960 rap [SA 500 his ilv lacZxA21, (λ ci857 Bam Nam 7 Nam 53 Δ H1) *cys* H: :Tn5 *zch*: : Tn10] (Guzmán, 1984). Estas bacterias se obtuvieron del cepario del laboratorio 3 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

4.2. Medios de cultivo y reguladores.

a) Medio Luria (LB). Por litro; 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl, se ajusta a pH 7.2 con NaOH 2M, para medio sólido se agregan 15 g de agar. (Miller, 1992)

b) Medio mínimo M9 suplementado. Para 100 ml.: 10 ml de mezcla de sales 10X (132g de Na₂HPO₄, 30g KH₂PO₄, 5g de NaCl, 10g de NH₄Cl) ; 85.1 ml de agua bidestilada estéril, 2.5 ml de glucosa al 20%, 0.1 ml de CaCl₂ 0.1M; 0.028 ml de MgSO₄ 1M; 0.0762 ml de MgCl₂ 1M; 2ml mezcla de aminoácidos 20X (excepto metionina); 0.2 ml de mezcla de vitaminas 100X (tiamina 10mM, biotina 10 mM). Esterilizar por filtración. (Miller, 1992).

c) Medio SOB. Por litro: 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl y 10 ml de KCl 250 mM. (Miller, 1992).

d) Medio TB. Por litro: 10 g de triptona y 5 g de NaCl, pH final 7.2. Para medio sólido se agregan 11 g de agar y para agar suave 7 g. Después de esterilizar por autoclave se adicionan 10 ml de $MgSO_4$ 1M estéril. El medio TB-D contiene además 10 ml de una solución al 20% de maltosa. (Miller, 1992)

e) Medio TØ. Por litro: 10 g de Triptona, 2.5 g de NaCl, 2 ml de NaOH 2%. Para medio sólido se agregan 10 g de agar y para agar suave 6 g. (Miller, 1992).

f) Solución SM (buffer para diluir fagos). Por litro: 1.21 g de Tris base, 1.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.1 g de gelatina. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl. (Maniatis, 1989).

g) Buffer 1: Acetato de potasio 30 mM, RbCl ó KCl 100 mM, $MnCl_2$ 50 mM, y 15 % glicerol ajustado a pH 5.8 con 0.2 M ácido acético y esterilizado por filtración.

h) Buffer 2: MOPS 10 mM, $CaCl_2$ 75 mM, $RbCl_2$ ó KCL 10 mM y 15 % glicerol llevado a pH 6.5 con KOH y esterilizado por filtración.

4.3. Condiciones de cultivo.

Durante este trabajo las bacterias fueron incubadas en cajas de medio LB y LB-ampicilina a una concentración de 50 $\mu g/ml$. Los cultivos se prepararon a partir de una sola colonia, procedente de una caja de LB o LB-ampicilina.

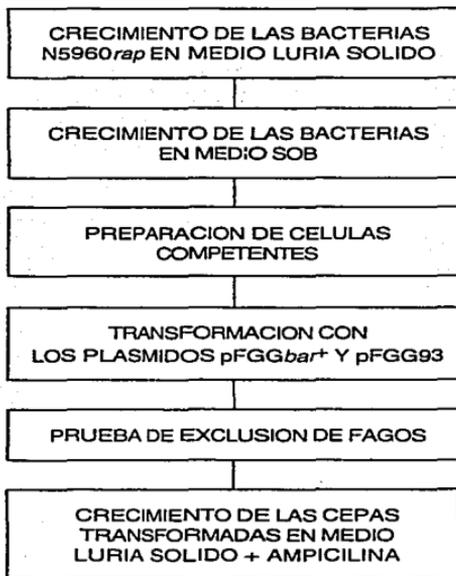
4.4. Preparación de células competentes.

Para inducir competencia en las bacterias N5960rap, se siguió el protocolo descrito por Hanahan (1983). Las bacterias se crecieron durante toda la noche en medio SOB complementado con $MgSO_4$ 10 mM. Se preparó una dilución 1:100 del cultivo en el mismo medio y se incubó a 37°C con agitación hasta una densidad óptica de 0.3 a 550 nm. El cultivo se pasó a un baño de hielo-agua durante 10 minutos. Las bacterias se mantuvieron a 4°C en los pasos siguientes y se trabajó en condiciones de esterilidad. Las células se centrifugaron a 2 500 rpm, 4°C (Rotor JA-20, Beckman) durante 10 minutos y se resuspendieron en buffer 1. Se agregaron 16 ml de buffer 1 por cada 50 ml de cultivo y se dejó 10 minutos en hielo. Se centrifugó como se mencionó anteriormente y se resuspendió en el buffer 2. Se agregaron 4 ml de buffer 2 por cada 50 ml de cultivo y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Se prepararon alícuotas de 0.5 ml y se almacenaron -70°C hasta su uso o bien se utilizaron inmediatamente para la transformación.

4.5. Transformación.

Se mezclaron 0.1 ml de bacterias competentes con 500 ng de DNA de plásmido pFGG93 ó pFGGbar⁺ y se incubaron en hielo-agua durante 30 minutos. Se dio un choque térmico a 42°C por 1 minuto y después se incubaron 5 minutos en hielo. Se agregó 1 ml de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 32°C con agitación. Para seleccionar las transformantes se espátulo 0.1 ml de la mezcla de transformación en cajas de LB-ampicilina (50 μ g/ml) y LB. Las cajas se incubaron a 32°C durante toda la noche. (Miller, 1992).

Cuadro 1. Diagrama de flujo para la transformación de la cepa N5960rap



4.6. Prueba de exclusión de Fagos.

El fenotipo Rap de las cepas transformadas se determinó por infección con el bacteriófago lambda. Se tomó una colonia de las cajas y se incubó a 32°C en 5 ml de medio TB-D con agitación durante toda la noche. Se mezclaron 0.1 ml del cultivo de toda la noche con 2.5 ml de medio TØ suave a 45°C y se vertió en una caja de TØ para formar un césped bacteriano. Una vez solidificado el agar (15 minutos), se colocaron 0.01 ml de diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) de los fagos *bart* y *bar*, sobre las bacterias. Esto se hizo por duplicado. Después de que se absorbieron las gotas, las cajas se incubaron a 32°C y 43°C, durante toda la noche.

4.7. Cinética de Crecimiento.

La cepa se expandió usando una dilución 1:50 del cultivo inicial hasta una OD de 0.4 (600 nm). El cultivo se dividió en dos fracciones y una de ellas se incubó a 32°C y la otra a 43°C. De las dos fracciones se tomaron muestras de 0.1 ml cada 30 minutos hasta completar 3 horas (Se consideró el tiempo 0 minutos cuando el cultivo llegó a una $OD_{600} = 0.4$). Se hicieron diluciones en medio SM y de estas se tomaron 0.1 ml y se espatularon sobre cajas de medio LB y LB-ampicilina (50 µg/ml), por duplicado. Las cajas se incubaron a 32°C durante toda la noche y las colonias se contaron con el cuenta colonias (Miller, 1972).

4.8. Marcaje Metabólico.

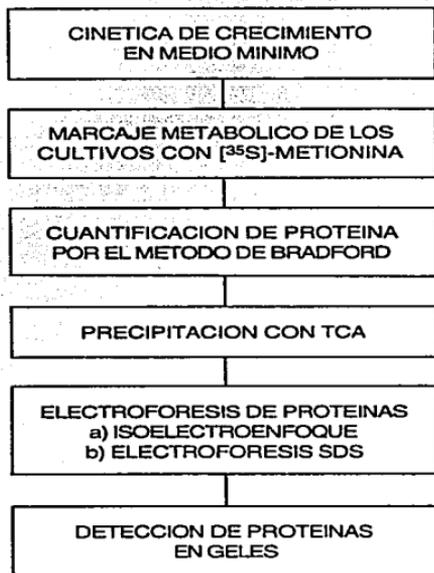
Las células se expandieron a 32°C hasta una OD de 0.4 partiendo de una dilución 1:50 de un cultivo inicial de toda la noche. Se adicionó ampicilina (50 µg/ml) y el cultivo se dividió en las fracciones A de 0.5 ml y B de 1ml.

La fracción "A" se marcó durante 10 minutos a 32°C, con 50 μ Ci de [³⁵S]-Metionina (1100 Ci/mmol, NEN-Dupont). Para parar el marcaje, se agregó metionina no radiactiva a una concentración final de 1.9 mM y se transfirió a hielo. La fracción "B" se preincubó a 43°C durante 90 minutos. Se tomaron 0.5 ml, y se marcaron durante 10 minutos a 43°C con 50 μ Ci de [³⁵S]-Metionina (1100 Ci/mmol, NEN-Dupont). Al final de este tiempo, se agregó metionina no radiactiva a una concentración final de 1.9 mM y se transfirió a hielo. Las células se centrifugaron después del marcaje a 14000 rpm, 15 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante-1 y se almacenó para medir el % de radiactividad no incorporada. La pastilla bacteriana se resuspendió con 0.3 ml de Regulador de Muestra (9.5M urea, 2 % NP-40, 2 % ampholytes, 5% 2-mercaptoetanol). Las células fueron rotas con tres ciclos repetidos de congelamiento-descongelamiento usando un baño de hielo seco-acetona y sonicación durante 20 segundos. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante-2 se transfirió a otro tubo. Los sobrenadantes obtenidos se guardaron a -72°C. (O'Farrel, 1975). Se determinó concentración de proteína y cpm en las muestras.

5.9. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, M.N., 1976). El reactivo se preparó de la manera siguiente: Se disolvieron 0.1g de Azul de Coomassie G-250, en 50 ml de etanol al 95 % y posteriormente se agregaron 100 ml de ácido fosfórico al 85 % y 850 ml de agua bidestilada y se mezclaron hasta disolverse. Las partículas se removieron con papel Whatman 3 Mm. Para la cuantificación de proteína, se mezclaron 0.007 ml de muestra más 0.094 ml de agua bidestilada y se adicionó 1 ml de reactivo Bradford. Se midió la absorbancia a 595 nm después de 2 minutos y antes de 1 hora de haber adicionado el reactivo de Bradford. Se utilizó como referencia una curva obtenida con cantidades conocidas de albúmina bovina (BSA).

Cuadro 2. Diagrama de flujo para la detección de proteínas



5.10. Precipitación con TCA.

En un tubo de 1.5 ml se mezclaron, 0,245 ml de NaOH 1M, con 0.01 ml de las fracciones marcadas con [³⁵S]-Metionina. Se incubaron a 32°C durante 10 minutos y se adicionó 1 ml de una solución de TCA 25 % y Casaaminoácidos 2%. Después de mezclar en vortex, los tubos se colocaron 30 minutos en un baño de hielo. Las muestras se filtraron al vacío a través de filtros de microfibras de vidrio (GF/A) tratados previamente con 1 ml de TCA al 5 %. Cada filtro se lavó tres veces con 3 ml de TCA al 5 % y se secaron con 1 ml de acetona fría. Las cpm totales se midieron goteando 0.01 ml de las fracciones marcadas con [³⁵S]-Metionina directamente sobre los filtros. Los filtros se secaron a 43°C durante 45 minutos. Las cuentas por minuto (cpm) de cada filtro se midieron usando 5 ml de líquido de centelleo en un contador de centelleo (LS 6500, BECKMAN) (Technical Bulletin, Promega).

5.11. Electroforesis Bidimensional.

En 1975 se desarrolló un nuevo método para el análisis de proteínas conocido como electroforesis bidimensional sobre gel. Al combinar las características de dos procedimientos diferentes de separación se pueden resolver más de 1000 proteínas distintas en forma de un mapa proteico bidimensional.

En la primer dimensión las proteínas son sometidas a electroforesis en un tubo estrecho de gel de poliacrilamida en el que se ha establecido un gradiente de pH mediante unas mezclas de amortiguadores especiales. Cada proteína se desplaza hasta la zona del gradiente con un pH igual a su punto isoelectrico y permanece allí. En la segunda dimensión las proteínas son fraccionadas de acuerdo con su tamaño mediante electroforesis a través de un gel de poliacrilamida con SDS (O'Farrell, 1975).

a) Isoelectroenfoque (IEF).

Las muestras fueron fraccionadas en la primera dimensión a través de geles capilares preparados de la manera siguiente: se utilizaron tubos de 15 cm de longitud, 3 mm de diámetro y 2 mm de grosor de la pared. Se cubrió un extremo con Parafilm y se colocó el tubo sobre una superficie vertical. Se agregó por un extremo 0.4 ml de la solución de isoelectroenfoque (5.5 g Urea, 1 ml solución de Monómeros I (40% T 5% Cbis), 2 ml NP-40 al 10%, 2.5 ml agua bidestilada, 0.4 ml Ampholine 5/8 (Pharmacia), 0.1 ml Ampholine 3.5/10 (Pharmacia), 0.007 ml TEMED, 0.01 Persulfato de Amonio 10%). Se agregó agua bidestilada hasta la superficie y el gel se dejó polimerizando durante 2 horas (Hoefel Scientific Instruments). Después de que los geles polimerizaron, los tubos se insertaron en la cámara de isoelectroenfoque (*vertical gel electrophoresis sistem*, BRL), se agregó la solución catódica (NaOH 0.2 N) en la parte superior de la cámara y se enjuagó la parte superior del gel con la misma solución. En la parte inferior de la cámara se agregó la solución anódica (H_3PO_4 10 mM). Se adicionaron 0.020 ml de solución de muestra (*Sample Overlay Solution*) (9M urea, 2% ampholytes) en la parte superior del tubo. Los geles se precorrieron, durante 15 minutos a 200 V, 30 minutos a 300 V y 30 minutos a 400 V. El corrimiento del gel disminuye con el tiempo debido a un incremento en la resistencia de los geles acompañado de la formación de un gradiente de pH.

Al término del precorrimiento, se removió la solución de muestra, con cantidades pequeñas de solución catódica. Las soluciones catódica y anódica se reemplazaron con soluciones nuevas. Los geles se cargaron con 30 μ g de proteína de las fracciones marcadas con [^{35}S]-Metionina, más 0.020 ml de solución de muestra. Se ajustó el voltaje a 400 V y se corrió la electroforesis durante 16 horas (O'Farrel, 1977).

b) Electroforesis SDS.

La segunda dimensión de las muestras se hizo a través de un gradiente de poliacrilamida de 7.5 al 15 %. El gel de la primera dimensión se colocó en la parte superior del gradiente y se selló con agarosa al 1 % en buffer concentrador (0.125 M Tris base pH 6.8, SDS 1 %). La electroforesis se ejecutó a 60 mA (cámara Hoefer Scientific Instruments) usando buffer pH 8.3 (0.025 M Tris, 0.192 M glicina, 0.1 % SDS) hasta que el frente de migración alcanzó el borde inferior (O'Farrel, 1977).

5.12. Detección de proteínas en geles.

Los geles se tiñeron durante toda la noche con una solución de 0.125 % Azul de Coomassie, 50 % metanol, 10 % ácido acético. Para desteñirlos se utilizó la misma mezcla sin el colorante durante 1 hora y se trataron dos veces con una solución de ácido acético al 7 % y metanol al 5 %, durante 30 minutos. En el caso de proteínas marcadas radiactivamente, los geles fueron tratados durante 30 minutos con solución Amplify (Amersham) y se transfirieron a una solución de glicerol al 10 % durante 20 minutos. Los geles fueron secados a 80°C sobre papel filtro Whatman y se expusieron a la película de Rayos X (Kodak) durante 22 horas (Hoefer Scientific Instruments).

CAPITULO V

RESULTADOS

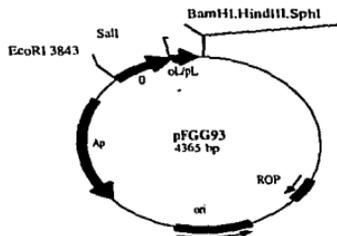
5.1. La sobre expresión de *bar⁺* afecta el crecimiento de la cepa *rap*.

Para determinar el efecto que produce la inducción de la transcripción a 43°C de la región *bar* del bacteriófago lambda en *Escherichia coli*, se realizaron cinéticas de crecimiento usando la cepa N5960, que porta la mutación *rap*. El plásmido pFGG*bar⁺* (Valadez G.) es un vector que expresa el RNA de la región *bar* silvestre del fago lambda, a partir del promotor pL.

En este plásmido, el promotor pL reprimido a 32°C por el represor termosensible cI857, se activa a 43°C, permitiendo la inducción de la transcripción de *bar⁺*. El plásmido pFGG93 (Valadez y Méndez), es el control de pFGG*bar⁺*, que no lleva *bar* (figuras 3a y 3b). La cepa N5960*rap*, fue transformada con los vectores mencionados y se monitoreó su crecimiento con y sin expresión de *bar⁺*.

La figura 4 muestra que a 32°C, donde la expresión de *bar⁺* está reprimida, la cepa N5960*rap*/pFGG*bar⁺* crece exponencialmente y sin pérdida de plásmido. En el experimento paralelo a 43°C la velocidad de crecimiento decrece después de 30 minutos de incubación, a consecuencia de la expresión de *bar⁺*; la reducción en la cuenta viable puede deberse a muerte y lisis celular. Estos resultados concuerdan con observaciones anteriores con plásmidos parecidos (Guzmán, 1990). Después de 90 minutos de incubación a 43°C, solamente 12% de las bacterias viables conservan el plásmido. A los 120 minutos de incubación a 43°C, cuando queda 1.2% de sobrevivientes, se observa que las células que han perdido el plásmido comienzan a crecer (medio sin Ap). Como se esperaba, no existe diferencia entre las cinéticas de crecimiento, la viabilidad celular y conservación del plásmido a 32 y 43°C, en la cepa N5960*rap*/pFGG93, donde no hay *bar⁺* (figura 5).

3a)



3b)

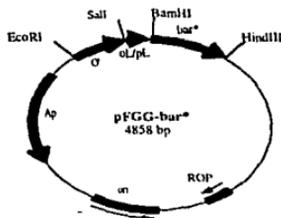


Figura 3. Construcción de los plásmidos pFGG93 y pFGGbar*. (3a) Plásmido pFGG93. Este vector que no expresa *bar*, fué construido al sustituir el fragmento HindIII-SphI de pDH520 (Guzmán P., 1990) por el siguiente polylinker: 5'AGCTGGATCCAAAAGCTTGCATGC-3' (Valadez G. y Méndez F.). (3b) Plásmido pFGGbar*. Este vector que expresa *bar*, fué construido al substituir el fragmento BamHI-HindIII de pFGG93, con un fragmento de 493pb del genoma del bacteriófago lambda, que contiene el RNA de *bar* silvestre (coordenadas 27972-27480(Valadez G.))

**Letalidad de células N5960rap/pFGGbar⁺,
en medio mínimo**

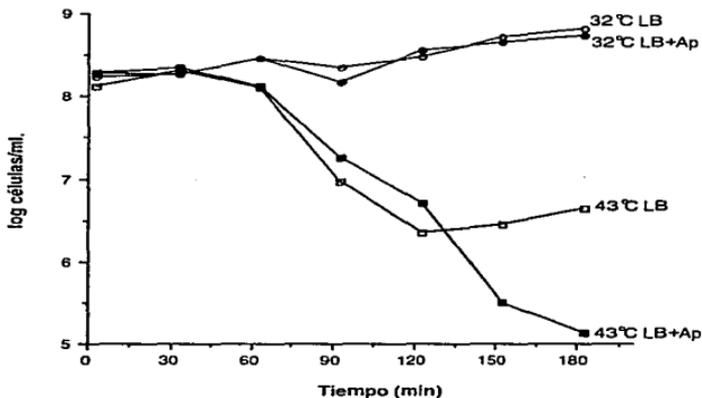


Figura 4. Cinética de viabilidad de células N5960rap/pFGGbar⁺, crecidas a 32 y 43°C. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo M9 suplementado a 32°C hasta fase logarítmica ($OD_{600}=0.4$). Posteriormente se dividieron y se crecieron continuamente a 32 y 43°C. A intervalos de 30 minutos se tomaron muestras de los cultivos y se determinó cuenta viable a 32°C en cajas de LB y LB+Ap.

**Ausencia de letalidad de células
N5960rap/pFGG93, en medio mínimo**

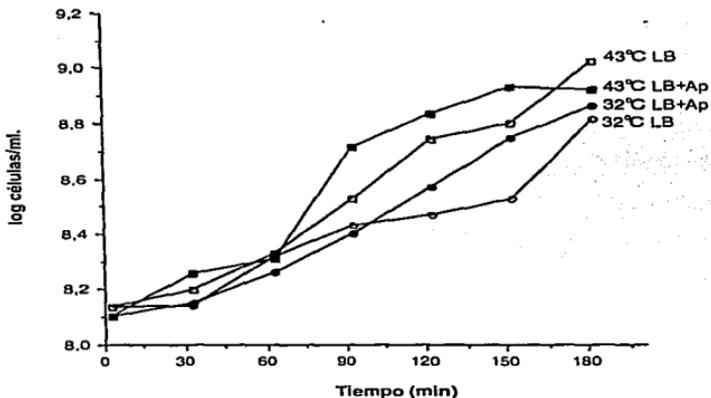


Figura 5. Cinética de viabilidad de células N5960rap/pFGG93, crecidas a 32 y 43°C. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo M9 suplementado a 32°C, hasta fase logarítmica ($OD_{600}=0.4$). Posteriormente se dividieron y se crecieron continuamente a 32 y 43°C. A intervalos de 30 minutos se tomaron muestras de los cultivos y se determinó cuenta viable a 32°C en cajas de LB y LB+Ap.

Con base a estos resultados, se tomaron 90 minutos de incubación a 43°C, considerando este tiempo como el adecuado para observar el efecto de la expresión de la región *bar*, sobre la síntesis de proteínas y la viabilidad de la célula huésped.

5.2. La disminución de la velocidad de crecimiento por acción de *bar*⁺, correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas.

Se ha postulado que la disminución de la velocidad de crecimiento podría ser consecuencia de la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas en la cepa rap (Pérez-Morga y Guarneros, 1990). Siendo rap una mutación en el gen *pth* que codifica para la peptidil-tRNA hidrolasa, posible blanco de la inhibición mediada por la expresión de *bar* una consecuencia natural de la actividad de *bar*⁺, podría ser una alteración de la síntesis de proteínas. Esta alteración puede verse reflejada como inhibición o activación de la síntesis de ciertas proteínas.

Para investigar esta relación primeramente se midió la síntesis de proteínas durante la expresión de *bar*⁺, realizando un marcaje metabólico de proteínas. En el estudio de alteración de síntesis de proteínas por *bar*⁺, se utilizó la cepa N5960rap/pFGG*bar*⁺. Dado que la desrepresión de la expresión de *bar*⁺ se hace por incubación a 43°C, se utilizaron las cepas N5960rap/pFGG93 y N5960/pFGG93 para identificar aquellas proteínas cuya síntesis pudiera verse afectada solamente por incremento de la temperatura o la fuerte transcripción a partir del promotor pL y no por efecto de *bar*⁺.

Se determinó la actividad de síntesis de proteínas por porcentaje de Metionina marcada radiactivamente incorporada durante expresión y no expresión de la región *bar*⁺. La Tabla 1 muestra disminución a la mitad en la incorporación de metionina a 43°C con respecto a 32°C en la cepa N5960/pFGG93 que no presenta la mutación rap y no expresa *bar*⁺. La cepa N5960rap/pFGG93 que tiene la mutación rap, pero su vector no expresa *bar*, presenta un ligero aumento al incrementar la temperatura a 43°C. Finalmente en la cepa

N5960rap/pFGG*bar*⁺ se observa que la incorporación a 32°C, en ausencia de expresión de *bar*⁺ disminuye drásticamente a 43°C.

TABLA 1. Porcentaje de incorporación de [³⁵S]-Metionina

CEPA/TEMP	32°C	43°C
N5960/pFGG93	64.0	35.0
N5960rap/pFGG93	24.0	36.0
N5960rap/pFGG <i>bar</i> ⁺	33.0	7.0
C600	25.0	32.0
C600pth ^{ts}	30.0	7.0

Bacterias crecidas en medio mínimo M9 suplementado, ver materiales y métodos. El porcentaje de incorporación se calculó de la siguiente manera: (%) = (MP)(CTP)/CTS X100.

La disminución de la concentración de la proteína Pth afecta la síntesis de proteínas de una manera muy parecida a la observada por efecto *bar*⁺. Para este estudio se utilizaron las cepas C600 y C600pth^{ts}, la cual contiene una mutación en el gen que codifica para Pth y le confiere el fenotipo termosensible (García-Villegas, et. al., 1991). En esta cepa el aumento de la temperatura a 43°C, induce muerte celular.

En ensayos de marcaje de proteínas, como los mencionados anteriormente, se encontró que en la cepa C600 al incrementar la temperatura a 43°C la incorporación de [³⁵S]-Metionina cambia ligeramente.

Al inactivar *pth^{ts}* por incremento de la temperatura a 43°C en la cepa C600 pth^{ts} la incorporación de [³⁵S]-Metionina disminuye a un valor semejante al obtenido en N5960rap, por efecto de *bar⁺* bajo las mismas condiciones.

5.3. La naturaleza de las proteínas inhibidas por *bar⁺* en *E. coli* es muy diversa.

Al encontrar disminución de la síntesis de proteínas por efecto de la expresión de *bar⁺*, se procede a la identificación de proteínas, cuya síntesis es afectada en la cepa N5960rap/pFGG*bar⁺*. Con esta intención, las proteínas presentes en los extractos marcados con [³⁵S]-Metionina se separaron en geles bidimensionales (ver materiales y métodos). El criterio para considerar que la expresión de una proteína está afectada por acción de *bar⁺* es que su síntesis sea alterada en condiciones de sobre expresión de *bar* y un fondo rap (Pérez-Morga y Guarneros, 1990).

a) Proteínas afectadas en la cepa N5960rap/pFGG*bar⁺* a 43°C.

En la figura 6 se muestra el efecto de la inducción de la transcripción de *bar⁺* por un tiempo de 90 minutos a 43°C, sobre la síntesis de proteínas en la cepa N5960rap/pFGG*bar⁺*. La disminución de la síntesis de proteínas que se observa en una cepa rap es drástica y general, a excepción de tres proteínas identificadas como "a", "b" y "c" (comparar figuras 6a y 6b). La disminución de estas proteínas no es tan drástica como en las demás.

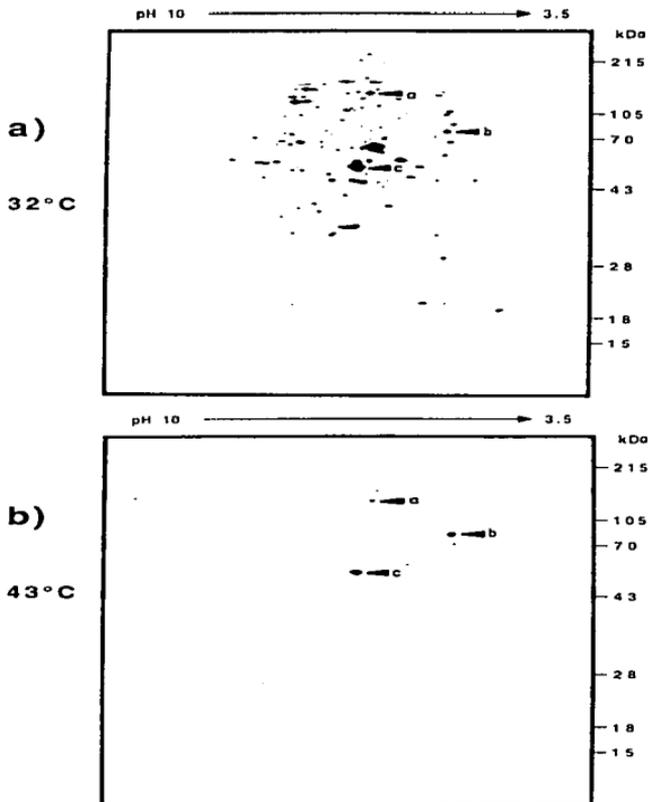


Figura 6. *N5960rap/pFGGbar⁺*. Proteínas afectadas por inducción de *bar* en un fondo genético *rap*. Los cultivos bacterianos se incubaron y las proteínas fueron marcadas, como se indica en materiales y métodos. a) 32°C, b) 43°C.

La proteína "a" es de un peso molecular entre 105 y 215 kDa. La proteína "b" presenta un peso mayor a 70 kDa y la proteína "c" presenta un peso entre 43 y 70 kDa.

b) Proteínas afectadas en la cepa N5960rap/pFGG93.

En la figura 7 se muestra el efecto que tiene el incremento de temperatura a 43°C sobre la síntesis de proteínas de la cepa N5960rap/pFGG93.

Las proteínas cuya síntesis se incrementa al aumentar la temperatura son cuatro, se identifican como "d", "e", "f", "g" (comparar figuras 7a y 7b).

La proteína "d" presenta un peso entre 43 y 70 kDa. La proteína "e" es de un peso menor a 70 kDa, la proteína "f" presenta un peso entre 43 y 70 kDa y la proteína "g" tiene un peso mayor a 18 kDa.

Las proteínas "h", "i", "j", "k", "l", "m", "n", "o"; disminuyen a 43°C (ver figura 7b). Las proteínas "h", "i", "j" son de un peso menor a 215 kDa, la proteína "k" presenta un peso entre 70 y 105 kDa, las proteínas "l", "m" son de un peso menor a 70 kDa, la proteína "n" es de un peso mayor a los 43 kDa y la proteína "o" es de aproximadamente 43 kDa.

c) Proteínas afectadas en la cepa N5960/pFGG93.

La figura 8 muestra el efecto que tiene el incremento de temperatura a 43°C sobre la cepa N5960/pFGG93.

Las proteínas que muestran un aumento en su síntesis son cuatro identificadas como "p", "q", "r", "s".

Las proteínas "p", "s", presentan un peso menor a 43 kDa, la proteína "q" es de un peso entre 70 y 105 kDa. Mientras que la proteína "r" presenta un peso mayor a 105 kDa (comparar figuras 8a y 8b).

Veintisiete proteínas que disminuyen en su síntesis son identificadas como: "h", "i", "j", "k", "m", "n", "t", "u", "v", "w", "x", "y", "z", "a1", "b1", "c1", "d1", "e1", "f1", "g1", "h1", "i1", "j1", "k1", "l1", "m1", "n1".

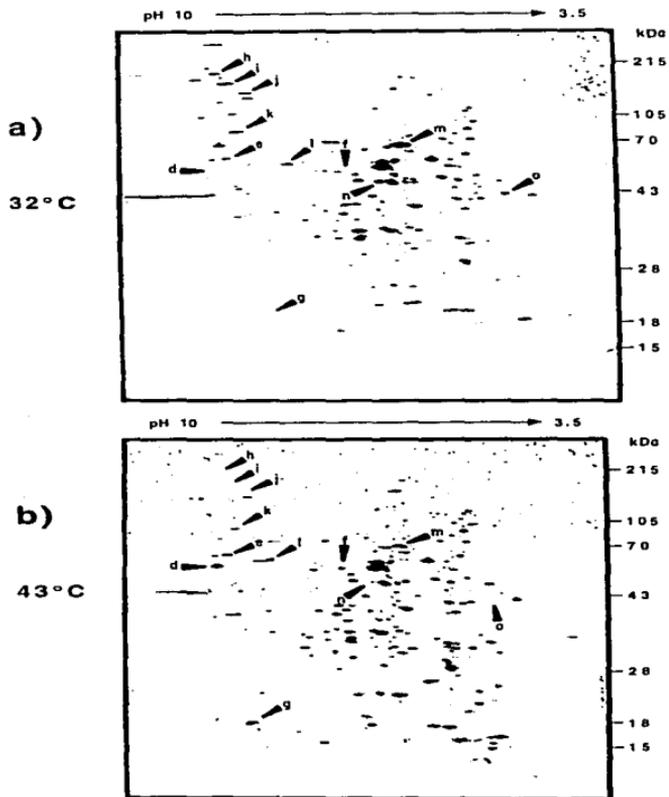


Figura 7. *N5960rap/pFGG93*. Proteínas afectadas por incremento de temperatura en un fondo genético *rap*. Los cultivos bacterianos se incubaron y las proteínas fueron marcadas, como se indica en materiales y métodos. a) 32°C, b) 43°C.

La proteína "t" es la mayor con un peso cercano a 215 kDa, las proteínas "h", "i", "j", "u", "v", "w", "x" son proteínas con un peso mayor a 105 kDa y las proteínas "k", "y", "z", "a1", "b1", "i1", son proteínas que presentan un peso entre 70 y 105 kDa. Ocho proteínas de entre 43 y 70 kDa fueron identificadas como "m", "n", "c1", "d1", "e1", "f1", "g1", "h1". La proteína "j1" es de un peso menor a 43 kDa, las proteínas "k1", "h1", son de un peso mayor a 28 kDa y las proteínas "m1", "n1" presentan un peso entre 15 y 18 kDa.

5.4. Efecto de la ausencia de actividad de la enzima Pth, sobre la síntesis de proteínas.

De igual forma se investigó el efecto posible de la mutación termosensible en Pth, sobre la síntesis de proteínas en la cepa C600pth^{ts}. Para esto, las proteínas presentes en los extractos marcados con [³⁵S]-Metionina, fueron separados en geles bidimensionales.

El criterio para considerar que la expresión de una proteína está afectada por acción de pth^{ts} con incremento o decremento en su expresión es que su síntesis esté alterada en condiciones de alta temperatura (Atherly y Menninger, 1972).

a) Proteínas afectadas en C600pth^{ts} a 43°C.

El crecimiento de células mutantes pth^{ts} a 43°C provoca una disminución de los niveles de actividad de la enzima Pth y una disminución de la síntesis de proteínas (Atherly y Menninger, 1972). Al comparar las figuras 9a y 9b, se observa que al incubar la cepa C600 pth^{ts} durante 90 minutos a 43°C, hay una inhibición muy severa en la síntesis de diversas proteínas como consecuencia de la deficiencia que se presenta en actividad Pth, a excepción de tres proteínas identificadas como "c", "o1", "p1" (ver figura 9b), la inhibición que presentan estas proteínas no es tan severa como en las demás.

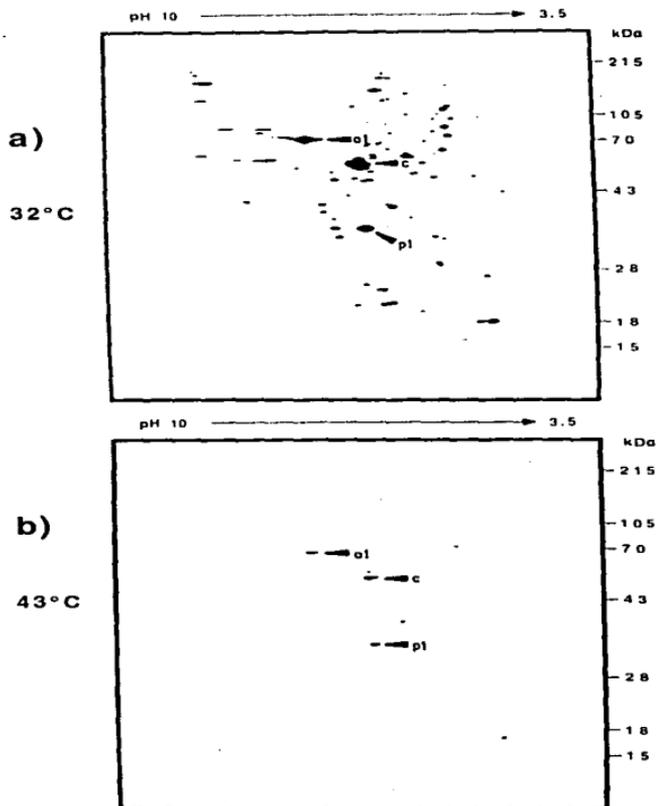


Figura 9. *C600pth15*. Proteínas afectadas por inactivación de *Pth* por incremento de temperatura. Los cultivos bacterianos se incubaron y las proteínas fueron marcadas, como se indica en materiales y métodos. a) 32°C, b) 43°C.

La proteína "c" tiene un peso entre 43 y 70 kDa, la proteína "o1" presenta un peso menor a 70 kDa, y la proteína "p1" tiene un peso entre 28 y 43 kDa.

b) Proteínas afectadas en C600 silvestre.

La figura 10a y 10b muestra diversas proteínas afectadas en la cepa C600 a 43°C. Las proteínas que aumentan son diez identificadas como: "d", "e", "c1", "g1", "h1", "q1", "r1", "s1", "t1", "u1".

Las proteínas "d", "e", "c1", "g1", "h1", "q1" son proteínas que presentan un peso entre 43 y 70 kDa, las proteínas "r1", "s1" presentan un peso menor a 43 kDa y las proteínas "t1", "u1" presentan un peso mayor a 18 kDa.

Las proteínas que disminuyen al incrementar la temperatura, son doce identificadas como: "i", "j", "k", "n", "o", "d1", "v1", "w1", "x1", "y1", "z1", "a2".

Las proteínas "i", "v1", "w1", "x1" son de un peso menor a los 215 kDa, mientras que la proteína "j" es de un peso mayor a 150 kDa. Las proteínas "k", "y1", "z1", presentan un peso entre 70 y 105 kDa. Las proteínas "d1", "a2" presentan un peso entre 43 y 70 kDa y las proteínas "n", "o" tienen un peso mayor a 43 kDa.

Se sintetizó de nuevo una proteína, identificada como "b2", de un peso cercano a 70 kDa.

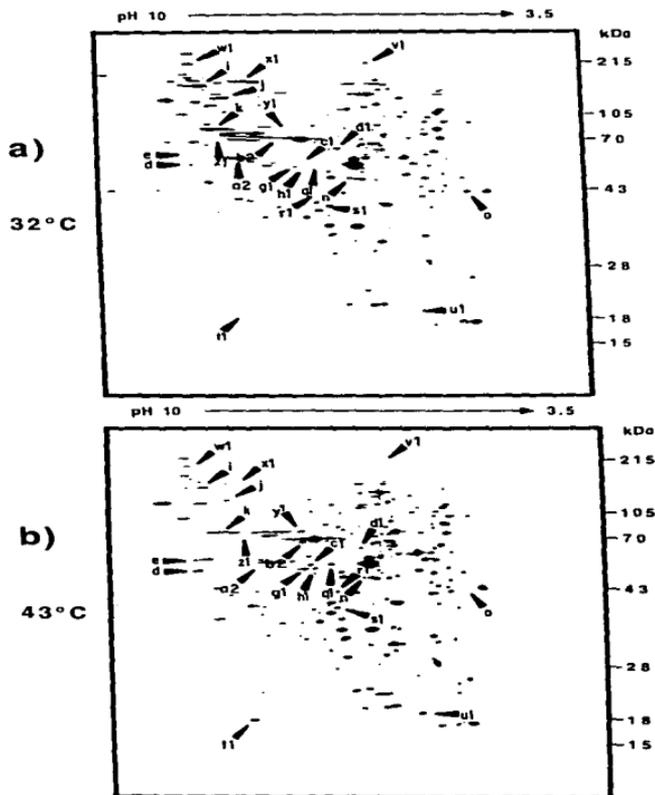


Figura 10. C600. *Proteínas afectadas por incremento de temperatura en un fondo genético silvestre.* Los cultivos bacterianos se incubaron y las proteínas fueron marcadas, como se indica en materiales y métodos. a) 32°C, b) 43°C.

CAPITULO VI

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En este trabajo se investigó el efecto de la expresión de *bar* sobre el crecimiento celular y la síntesis de proteínas en bacterias *pth(rap)* y el efecto de la reducción de la actividad de la enzima Pth sobre la síntesis de proteínas en bacterias *pth(ts)*.

6.1. La transcripción de *bar* y la baja concentración de la enzima *pth(ts)* a 43°C afecta la viabilidad celular.

Pérez-Morga (1990) mostró que la transcripción de *bar* en células N5960rap produce muerte celular. El observó que durante los primeros 30 minutos de incubación a 43°C, el crecimiento celular disminuyó aproximadamente un logaritmo y a 120 minutos de incubación la viabilidad disminuyó tres logaritmos. En los resultados obtenidos en este trabajo, se observa que durante los primeros 30 minutos de transcripción de *bar* a 43°C, en la cepa N5960rap/pFGG*bar*⁺, la viabilidad celular permanece estable por una hora y después disminuye rápidamente (ver figura 4).

Menninger (1979) mostró que la inactivación de la enzima *pth(ts)* produce muerte celular. El observó que durante los primeros 10 minutos de incubación a 43°C la viabilidad celular permanece estable, y luego disminuye rápidamente a 60 minutos de incubación y observó que el crecimiento celular disminuyó dos logaritmos.

6.2. *bar*⁺, disminuye la síntesis de proteínas en cepas rap.

Trabajos realizados por Pérez-Morga (1990) han demostrado que la transcripción de *bar* disminuye la síntesis de proteínas en cepas de *Escherichia coli pth(rap)*. En los resultados obtenidos, se puede

observar que al inducir la transcripción de la región *bar*⁺ en la cepa N5960rap/pFGG*bar*⁺ a 43°C, la síntesis de proteínas disminuye en forma general (figuras 6a y 6b). Excepto por las proteínas "a", "b", "c", que todavía se observan después de 90 minutos de inducción de *bar* (ver figura 6b). Estas proteínas podrían ser proteínas que escapan a la inhibición por *bar*⁺ o en las que la inhibición es solamente parcial.

6.3. La síntesis de ciertas proteínas disminuye por incremento de la temperatura en la cepa N5960rap/pFGG93.

No todas las proteínas son inhibidas por la expresión de *bar*⁺. En la cepa mutante rap que porta el vehículo vacío (N5960rap/pFGG93), se observa una disminución de la síntesis de algunas proteínas al incrementar la temperatura (ver figura 7a y 7b: "h", "i", "j", "k", "l", "m", "n", "o"). Por el contrario, en las proteínas "d", "e", "f", "g" es evidente un incremento en su síntesis (ver figura 7b).

6.4. La síntesis de proteínas disminuye por incremento de la temperatura en la cepa N5960/pFGG93.

Al incrementar la temperatura a 43°C, en la cepa N5960/pFGG93 se observa disminución de la síntesis de las proteínas "h", "i", "j", "k", "m", "n", "t", "u", "v", "w", "x", "y", "z", "a1", "b1", "c1", "d1", "e1", "f1", "g1", "h1", "i1", "j1", "k1", "l1", "m1", "n1" (figura 8b). Esta disminución es menos evidente en la cepa mutante rap N5960rap/pFGG93 (figura 7b: "h", "i", "j", "k", "l", "m", "n", "o"). La síntesis de las proteínas "h", "i", "j", "k", "m", "n" disminuye con el incremento de temperatura en la cepa N5960/pFGG93 y son las mismas proteínas que disminuyen en la cepa mutante rap (ver inciso b, tabla 2) a excepción de la proteína "l" que disminuye en la cepa mutante rap. También se observa que la síntesis de las proteínas

"p", "q", "r", "s" aumenta en la cepa N5960/pFGG93 con el incremento de temperatura (figura 8b).

6.5. La baja actividad de la enzima Pth disminuye la síntesis de proteínas.

El crecimiento de células mutantes *pth(ts)* a 43°C produce una disminución de los niveles de actividad de la enzima Pth, y una disminución de la síntesis de proteínas (Atherly y Menninger, 1972).

Al incrementar la temperatura de incubación en la cepa C600 pth^{ts} , se produce una disminución general de la síntesis de proteínas (figura 9a y 9b). Esta inhibición es semejante a la que se observa por la expresión de la secuencia *bar⁺* (ver figuras 6b y 9b). En ambas cepas, existen tres proteínas que después de 90 minutos de incubación a 43°C, siguen siendo evidentes (figura 9b: "c", "o1", "p1"). Cabe señalar que las proteínas "o1" y "p1" no son las mismas que escapan al efecto de *bar⁺* en la cepa N5960 $rap/pFGGbar⁺$; y la proteína "c" es la misma que escapa a la inhibición por la expresión de *bar⁺* (ver inciso a, tabla 2, figura 6b y 9b).

6.6. La síntesis de ciertas proteínas disminuye por incremento de la temperatura en la cepa C600.

El incremento en la temperatura de incubación en la cepa silvestre C600, produce disminución en la síntesis de las proteínas "i", "j", "k", "n", "o", "d1", "v1", "w1", "x1", "y1", "z1", "a2" (figura 10b), semejante a lo que ocurre en la cepa N5960/pFGG93. De este grupo de proteínas, la proteína "d1" también disminuye en la cepa N5960/pFGG93 (ver inciso c, tabla 2, figura 8b y 10b). De igual forma, la síntesis de la proteína "o" disminuye en la cepa N5960 $rap/pFGG93$ (ver inciso b, tabla 2, figura 7b y 10b). También, se observa que la síntesis de las proteínas "d", "e", "c1", "g1", "h1", "q1", "r1", "s1", "t1", "u1" aumentan en la cepa C600 al

incrementar la temperatura (figura 10b). La síntesis de las proteínas "d" y "e", de igual forma aumentan en la cepa N5960rap/pFGG93 (ver inciso b, tabla 2, figura 7b y 10b). La síntesis de las proteínas "c1", "g1" y "h1" disminuyen en la cepa N5960/pFGG93 al incrementar la temperatura (ver inciso c, tabla 2, figura 10b y 8b). El incremento de la temperatura en C600 generó una nueva proteína ("b2") de aproximadamente 70 KDa, esta proteína solamente se identificó en la cepa C600 a 43°C (figura 10b).

Tabla 2. Proteínas que sufren cambios en dos cepas diferentes

Proteínas a 32°C/43°C														
Cepas	"c"	"d"	"e"	"h"	"i"	"j"	"k"	"m"	"n"	"o"	"c1"	"d1"	"g1"	"h1"
N5960rap/pFGGbar ^t	N/SE													
N5960rap/pFGG93	N/A	N/A	N/D											
N5960/pFGG93				N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D		N/D	N/D	N/D	N/D
C600pth ^{ts}	N/SE													
C600	N/A	N/A									N/D	N/A	N/D	N/A

N: la síntesis de proteínas a 32°C se considera normal en las diferentes cepas.

La síntesis de proteínas a 43°C se ve alterada de la siguiente forma:

SE: Sigue Evidente

A: Aumenta

D: Disminuye

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

1. Los resultados de este trabajo muestran que la expresión de *bar*⁺ en la mutante *pth(rap)* o la reducción de la actividad de la enzima Pth en la mutante *pth(ts)* por incremento de temperatura, inhiben la síntesis de proteínas en forma general.
2. La expresión de *bar* a 43°C de la cepa N5960rap/pFGG*bar*⁺ produce muerte celular y pérdida del plásmido pFGG*bar*⁺, como ha sido reportado con otros plasmidos que expresan *bar*.
3. La letalidad celular que produce la transcripción de *bar* es parecida a la que se produce por disminución de la actividad de la enzima *pth(ts)*.
4. Existen tres proteínas que no son afectadas drásticamente por la transcripción de *bar*, y tres por la disminución de la concentración de la enzima Pth, solamente la proteína denominada "c" se encontró en ambos casos.
5. Si bien la transcripción de *bar* y la baja concentración de la enzima Pth inhiben la síntesis de proteínas, también el incremento de temperatura disminuye la síntesis de algunas proteínas, esta disminución es mas evidente en la cepa N5960/pFGG93 que en las cepas N5960rap/pFGG93 y C600.
6. El incremento de temperatura produce un aumento en la síntesis de algunas proteínas en las cepas N5960rap/pFGG93, N5960/pFGG93 y C600.

7. La cepa C600 generó una nueva proteína al incrementar la temperatura de incubación, esta proteína denominada "b2" de aproximadamente 70 kDa, no fue identificada en las cepas N5960rap/pFGG~~bar~~⁺, N5960rap/pFGG93, N5960/pFGG93 y C600p~~th~~^{ts}.

8. En los ensayos de marcaje metabólico de proteínas con [³⁵S]-Metionina de las cepas N5960rap/pFGG~~bar~~⁺ y en C600p~~th~~^{ts} a 43°C, la incorporación disminuye aproximadamente cuatro veces con respecto a la incorporación que se presenta a 32°C.

9. La existencia de la base de datos ExpASy, podría proporcionar información sobre la naturaleza de algunas de las proteínas identificadas en este trabajo, pero para ello, sería necesario realizar experimentos de resolución de proteínas en geles bajo las mismas condiciones usadas en esta base de datos.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CAPITULO VIII

REFERENCIAS

Arber, W., L. Enquist, B. Hohn, N. Murray y K. Murray. 1983. Experimental methods for use with lambda. En: Hendrix, R.W., J. W. Roberts, F.W. Stahl y R.A. Weisberg (eds.). Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York. pp. 403-466

Atherly, A. G. y Menninger, J. R. 1972. Mutant *E. coli* strain with temperature sensitive peptidyl-transfer RNA hydrolase. *Nature New Biol.* 240:245-246.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brooks, K., 1965. Studies in the physiological genetics of some suppressor-sensitive mutants of bacteriophage lambda. *Virology* 26:489.

Capecchi, M. R. y H. A. Klein. 1969. Characterization of three proteins involved in polipeptide chain termination. *Cold Spring Symp. Quant. Biol.* 34:469-478.

Caskey, T., E. Scolnik, R. Tomkins, J. Goldtein y G. Millman. 1969. Peptide chain termination, codon, protein factor, and ribosomal requirements. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34:479-491.

Cohen, S. N. y A. C. Y. Chang. 1970. Genetic expression in bacteriophage lambda. III. Inhibition of *Escherichia coli* nucleic acid and protein synthesis during lambda development. *J. Mol. Biol.* 49:557-575.

Court, D. y Sato, K., 1969. Studies of novel transducing variants of lambda: dispensability of genes N and O. *Virology* 39:348.

Craigen, W. P. y C. T. Caskey. 1987. The function, structure and regulation of *Escherichia coli* peptide chain release factors. *Biochimie*. 69:1031-1041.

Daniels, D. L., J. L. Schroeder, W. Szybalski, F. Sanger, A. R. Coulson, G. F. Hong, D. L. Hill, G. B. Petersen y F. R. Blattner. 1983. Apéndice II. Complete annotated lambda sequence. En: Hendrix, R. W., J. W. Roberts, F. W. Stahl y R. A. Weisberg (eds) Lambda II Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. pp. 519-676.

David Rawin J., 1989. BIOQUIMICA. Ed. Interamericana McGraw-Hill. Volumen II, pp 537-1105.

Echols, H., 1972. Developmental pathways for the temperate phage: Lysogeny. *Ann.Rev. Genet.* 6:157.

Emr, S. D., Schwartz, M. y Silhavy, T. J., 1978. Mutations altering the cellular localization of the phage lambda receptor, an *E. coli* outer membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:5802

Fiantd, M., Honigman, A., Rosenvold, E.C. y Szybalski. W. 1977. Precise measurement of the b2 deletion in coliphage lambda. *Gene* 2:289.

Friedman, D. I., Olson, E. R., Georgopoulos, C., Tilly, K., Herskowitz, I. and Banuett, F., 1984. Interactions of bacteriophage and hosts macromolecules in the growth of bacteriophage lambda. *Microbiol. Rev.* 48:299-325.

García-Villegas, M. R. 1991. La peptidil-tRNA hidrolasa de *E. coli* en la inhibición por los sitios *bar* de lambda. Tesis de doctorado. Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Instituto Politécnico Nacional.

García-Villegas, M. R., F. M. de la Vega, J. M. Galindo, M. Segura, R. H. Buckingham y G. Guarneros. 1991. Peptidyl-tRNA hydrolase is involved in lambda inhibition of host protein synthesis. *EMBO J.* **10**:3549-3555.

Guarneros, G. y Echols, H. 1970. New mutants of bacteriophage lambda with a specific defect in excision from host chromosome. *J. Mol. Biol.* **47**:265.

Guzmán, P. 1984. Una nueva interacción del bacteriófago lambda con su huésped. Tesis doctoral. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Instituto Politécnico Nacional. México.

Guzmán, P. and Guarneros, G. 1989. Phage genetic sites involved in lambda growth inhibition by the *Escherichia coli rap* mutant. *Genetics* **121**:401-410.

Guzmán, P., B. E. Rivera Chavira, D.L. Court, M. E. Gottesman y G. Guarneros. 1990. Transcription of a bacteriophage lambda DNA site blocks growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:1030-1034.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.

Harris, A. W., D. W. A. Mount, C. R. Fuerst, and L. Siminovitch. 1967. Mutations in bacteriophage lambda affecting host cell lysis. *Virology* **32**:553

Henderson, D. and Weil, J. 1976. A mutant of *Escherichia coli* that prevents growth of phage lambda and is bypassed by lambda mutants in a nonessential region of the genome. *Virology* 71:546-559.

Hershey, A.D. y Dove, W.F. 1971. Introduction to lambda. In: Hershey, A.D. (ed), The bacteriophage lambda, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York. pp 3.

Herskowitz, I. 1973. Control of gene expression in bacteriophage lambda. *Annu. Rev. Genet.* 7:289.

Herskowitz, I. y Hagen, D. 1980 The lysis-lysogeny decision of phage lambda: explicit programming and responsiveness. *Ann. Rev. Genet.* 14:399

Hove-Jensen, B. 1985. Cloning and characterization of the *prs* gene encoding phosphoribosylpyrophosphate syntetase of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 201:269-276.

Jacob, W.F., M. Santer y A. E. Dahlberg. 1987. A single base change in the Shine - Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4757-4761.

Joyner, A., Isaaca, L.N., Echols, H. y Sly, W. 1966. DNA replication and messenger RNA production after induction of wild-type lambda bacteriophage and lambda mutants. *J. Mol. Biol.* 19:174.

Kozak, M. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* 47:145.

Lederberg, E. M. 1951. Lysogenicity in *E. coli* K-12. *Genetics* 36:560.

Lewin, B. 1977. Phage lambda: infective pathways, in Gene expression. Vol 3 (John Wiley and sons, eds.) 272. USA.

- Lewin, B. 1990. Genes IV. Oxford University Press and Cell Press. New York.
- Mendez Canseco, R. F.. 1994. Análisis del efecto de mutaciones en las regiones *sib* y *bar* en la exclusión de plásmidos en *Escherichia coli* *rap*. Tesis de maestría. Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de estudios Avanzados. Instituto Politécnico Nacional.
- 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.
- Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, J. H., ed. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Murialdo, H. y L. Siminovitch. 1972. The morphogenesis of bacteriophage lambda. IV. Identification of gene products and control of the expression of morphogenetic information. *Virology* **48**:785
- O'Farrell, P. Z. and Goodman, H. M. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell.* **12**:1133-1142.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J.Biol. Chem.* **250**:4007-4021.
- Parkinson, J. S. 1968. Genetics of the left arm on the chromosome of bacteriophage lambda. *Genetics* **59**:311.

Pérez-Morga, D. and Guarneros G. 1990. A short DNA sequence from lambda Phage inhibits protein synthesis in *Escherichia coli* rap. *J. Mol. Biol.* **216**:243-250.

Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. 2da. ed. pp 1.3-1.6.

Schneider, R. J. 1987. Impact of virus infection on host cell protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**:317-332.

Shine, J. y L. Dalgarno. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:1342-1346.

Szybalski, E. H. y W. Szybalski. 1979. A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene* **7**:217

Valadez Sánchez G. Tesis doctoral. Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Instituto Politécnico Nacional.

Vollenweider, H. J., James, A. y Szybalski, W. 1978. Discrete length classes of DNA depend on mode of dehydration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**:710.

Weigle, J. 1966. Assembly of phage lambda in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **55**:1462.

Weisberg, R.A., Gottesman, S. y Gottesman, M. E. 1977. Bacteriophage lambda: The lysogenic pathway. In "comprehensive Virology". (Fraenkel, H., Conrat. and Wagner, E. R. eds.), Vol. 8:197. Plenum Press, New York.

Wilson, J. H., J. Kim y J. Abelson. 1972. Bacteriophage T4 transfer RNA. III. Clustering of the genes for T4 transfer RNA's. *J. Mol. Biol.* 71:547-556.

Yarmolinsky, M. B. 1971. Making and joining DNA ends. En the Bacteriophage lambda (ed. A. D. Hershey.). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.