



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"IZTACALA"

B0292/86
E88 Ej. 2
Biología

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MUTANTES DE *Escherichia coli* DEFICIENTES EN FACTORES DE TERMINACION DE LA TRANSCRIPCION.

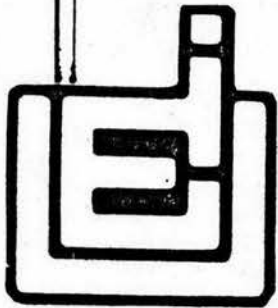
T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

FCO. JAVIER ESTRADA MENA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"IZTACALA"

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MUTANTES DE *Escherichia coli* DEFICIENTES EN FACTORES DE TERMINACION DE LA TRANSCRIPCION.

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

FCO. JAVIER ESTRADA MENA

Este trabajo se realizo en el Departamento de Genetica y Biologia Molecular del Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, en el laboratorio dirigido por la Dra. Cecilia Montañez Ojeda y fue subvencionado por el CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (proyecto 020940) y por el CONSEJO DEL SISTEMA NACIONAL DE EDUCACION TECNOLOGICA (proyecto 1617).

"Toda la vida en la tierra esta estrechamente relacionada. Tenemos una quimica organica comun y una herencia evolutiva comun. Hay decenas de miles de millones de tipos conocidos de moleculas organicas. Sin embargo en las actividades esenciales de la vida solo se utiliza una cincuentena. Las mismas estructuras se utilizan una y otra vez de modo conservador e ingenioso, para llevar a cabo funciones diferentes. La celula viviente es un regimen tan complejo y bello como el reino de las galaxias y de las estrellas".

Carl Sagan
C O S M O S

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Cecilia Montañez Ojeda por el apoyo y la valiosa dirección en la realización de este trabajo.

A mis compañeros Alejandra, Aurelio, Adalbertho, Alfredo, Bulmaro Carlos, Silvia y Yolanda por su apoyo y auxilio técnico.

CONTENIDO

	Pag.
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	VII
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	12
Medios de cultivo y soluciones utilizadas	12
Mutagenesis con nitroso-guanidina	16
Duracion de plasmidos con naranja de acridina	16
Identificacion de B-lactamasa	17
Metodo rapido para aislamiento de DNA de plasmidos	17
Geles de agarosa	19
Preparacion de celulas competentes	19
Transformacion bacteriana (cloruro de rubidio)	19
Transformacion bacteriana (cloruro de calcio)	20
Crecimiento en presencia de nitrofurantoina	21
Transduccion mediante el bacteriofago P1	21
RESULTADOS	23
Cracterizacion de las cepas utilizadas	23
Aislamiento de mutantes deficientes en terminacion (det)	26
Caracterizacion de los candidatos deficientes en terminacion	28
(A) Determinacion del fenotipo Rec A utilizando nitrofurantoina	40
(B) Analisis del efecto de la rifampicina sobre el	

crecimiento de las mutantes aisladas	43
Localizacion genetica de las mutaciones del	46
(A) Construccion de cepas poliauxotrofas gal K ⁺ (pkg1800tI)	46
(B) Transduccion de las mutaciones del	51
DISCUSION	56
BIBLIOGRAFIA	63

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura A. Estructura secundaria en las señales de terminacion transcripcional	10
Figura B. Mapa del plasmido pKG1800tI	11
Figura 1. Migracion del plasmido pKG1800tI	34

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Caracterizacion de cepas de E. coli utilizadas	25
Tabla 2. Eficiencia de obtencion de mutantes capaces de metabolizar galactosa	27
Tabla 3. Caracterizacion de los candidatos mutantes con respecto a los fenotipos Nus y Rec A	30
Tabla 4. Caracterizacion de los candidatos det curados del plasmido pKG1800tI	32
Tabla 5. Transformacion de los candidatos det con el plasmido pKG1800tI	35
Tabla 6. Fenotipo Nus y Rec A de los candidatos det curados y transformados	36
Tabla 7. Curacion de plasmidos con naranja de acridina	38
Tabla 8. Transformacion del candidato 8-1 con el plasmido pKG1800tI	39
Tabla 9. Determinacion del fenotipo Rec A utilizando nitrofurantoina	41
Tabla 10. Caracterizacion del fenotipo Rec A utilizando	

nitrofurantoina	42
Tabla 11. Crecimiento de bacteriofagos lambdoides en los candidatos mutantes	44
Tabla 12. Sensibilidad de las mutantes det a la rifampicina	45
Tabla 13. Sensibilidad al antibiotico estreptomcina	47
Tabla 14. Transformacion de la cepa AB1157 con los plasmidos pKG1800 y pKG1800tI	48
Tabla 15. Transduccion de la mutacion gal K a las cepas CA8000 y 603	50
Tabla 16. Transformacion de las cepas 603 gal K ⁻ y CA8000 gal K ⁻ con el plasmido pKG1800tI	52
Tabla 17. Transduccion de la cepa AB1157 pKG1800tI con las distintas mutaciones det	55

INTRODUCCION.

Los sistemas biologicos poseen moléculas orgánicas clave que llevan a cabo miles de reacciones responsables de mantener la complejidad que caracteriza a los sistemas vivos. Las miles de reacciones bioquímicas que ocurren en las células son controladas mediante mecanismos regulatorios que operan a diferentes niveles. Estos mecanismos regulatorios permiten a los organismos mantener un orden funcional que tiende a ser preservado a través de procesos evolutivos, confiriendo ventajas a los organismos que los poseen.

El renacimiento de la investigación biológica que ocurrió en los últimos treinta años se ha debido esencialmente a estudios concernientes a la regulación génica en procariotas y eucariotas.

La expresión génica está controlada, en parte, a nivel de la transcripción. El genoma de los procariotas está organizado en unidades transcripcionales, que incluyen señales específicas llamadas promotores; sitios en donde se inicia la transcripción y señales, llamadas terminadores responsables de la terminación de la cadena de RNA. Se han encontrado también, terminadores transcripcionales dentro de algunas unidades transcripcionales (1,2).

Actualmente, la terminación transcripcional está emergiendo como un importante y poderoso mecanismo de control de la expresión génica (4). La formación de un RNA se inicia con la unión de una molécula de holoenzima de RNAPolimerasa (RNA-pol) a

DNA en la region del promotor, seguida de la elongacion de la cadena de RNA durante el movimiento de la RNA-pol a lo largo del DNA.

La teoria del operon propuesta por Jacob y Monod (3a, 3b) considera a los operones como unidades transcripcionales que contienen uno o mas genes estructurales. Estos genes codifican para la sintesis de proteinas (enzimas) relacionadas funcionalmente y que catalizan varias etapas de una ruta metabolica. La expresion de estos genes puede estar regulada a nivel de iniciacion de la transcripcion por una interaccion entre factores activadores de la transcripcion, moleculas represoras y RNA-polimerasa (proteina responsable del proceso transcripcional) en los loci operador-promotor del operon. La presencia de señales terminadoras de la transcripcion dentro de las unidades no fue considerada en esta teoria.

Todo

Puede considerarse que la terminacion de la transcripcion se presenta como resultado de los siguientes eventos:

- (a) El cese del movimiento de la RNA-pol y de la cadena creciente de RNA en el terminador,
- (b) La liberacion de la cadena de RNA terminada,
- (c) La disociacion de la RNA-pol del molde de DNA (1).

Una de las características sobresalientes que se presentan en los terminadores de transcripcion es la estructura secundaria de tallo-asa que puede adquirir el RNA en el extremo 3'-OH. Ver Figura A. Inicialmente los terminadores se clasificaron de acuerdo a su dependencia funcional con respecto a un factor

bacteriano llamado Rho. Esta proteina cataliza terminacion transcripcional en terminadores especificos y fue el primer factor proteico que se describio por su participacion en esta funcion (5). Los fragmentos de DNA en donde ocurre terminacion transcripcional, cuando son incubados con RNA-pol y ribunucleosidos trifosfatos, contienen terminadores Rho-independientes, el punto de terminacion se localiza mas alla de una secuencia G-C y dentro de una region rica en uracilos (1). La comparacion de las secuencias de varios terminadores independientes de Rho ha revelado tres características comunes:

- (a) Una region con simetria diaxial, que consiste en una secuencia invertida y repetida que precede al sitio de terminacion.
- (b) La presencia de residuos de Uridina (U) localizados al final del RNA, en los cuales se localiza el sitio de terminacion (1).
- (c) Secuencias ricas en Guanina-Citocina (G-C) de longitud variable (de tres a once pares de bases) que se encuentran precediendo al sitio de terminacion (2). Ejemplos de estos terminadores se han encontrado en DNA del operon para la sintesis de triptofano (trp) de E. coli o de Salmonella y DNAs de los colifagos T7, T3, oX 174 y lambdoides.

El terminador trI del bacteriofago lambda es Rho-independiente y se han aislado mutaciones que afectan su estructura, obteniendose consecuencias fisiologicas. La mutacion cin incrementa la eficiencia de este

terminador (6). Se han aislado pseudorevertantes de λ cin que llevan una segunda mutación, *onc*, la cual reduce la terminación en tR1 (6). El análisis de la secuencia de nucleótidos muestra que las mutaciones *cin* y *onc* modifican el apareamiento en la estructura del tallo del terminador tR1. Las mutaciones *cin* incrementan el número de bases apareadas en el tallo del terminador, mientras que las mutaciones *onc* lo reducen. Estos resultados sugieren que es importante la estructura tallo-asa en la terminación (8).

En los terminadores Rho dependientes se ha determinado que en algunos casos, ocurre terminación en una secuencia rica en A-T, que está precedida por una región común (CA)ATAAA (2). En ausencia de la proteína Rho, la RNA-pol solamente hace una pausa en los terminadores Rho-dependientes. Se han encontrado señales de terminación Rho-dependientes en el DNA bacteriano y en el DNA del elemento de inserción IS2 entre otros.

Mediante ensayos *in vitro* se han encontrado dos clases de terminadores Rho-dependientes: aquellos que son activos a bajas concentraciones de Rho por ejemplo, las señales de terminación situadas al final del operón *gal* y dentro del elemento de inserción IS2 y una segunda clase que requiere de niveles altos de Rho para su actividad representadas por señales de terminación dentro de operones tales como *gal* y *lac* (1).

Para que la proteína Rho de *E. coli* catalice la terminación requiere de ribonucleosidos trifosfato, los cuales, son hidrolizados en una reacción dependiente de RNA, ribonucleosidos

difosfato y fosfato inorganico (9,10). La proteina Rho tiene un peso molecular de 52 Kilodaltones (Kd) y se ha determinado que tanto las formas monomerica como la tetramerica de la enzima tienen actividad de NTPasa, mientras que la forma de tetramero o de oligomero son necesarias para la terminacion de la transcripcion (11,12).

Con respecto al mecanismo de accion del factor Rho se propone que este se une a la cadena naciente de RNA y se mueve a lo largo de esta cadena en direccion 5'--->3' acercandose a la RNA-pol. La hidrolisis de NTP proporciona la energia para el movimiento de la proteina. Eventualmente, Rho hace contacto con la RNA-pol que ha hecho una pausa en un sitio terminador Rho-dependiente y reacciona con esta resultando la liberacion de la cadena naciente de RNA (1).

Por otra parte, se ha identificado una clase importante de genes de E. coli, los loci nus, cuyos productos participan en la actividad de pN, proteina codificada por el bacteriofago lambda que es clave en el proceso de antiterminacion (13,14). Las mutaciones nus se han localizado en cinco loci: nus A (minuto 69 del mapa de E. coli), nus B (min. 11), nus C (min. 88), nus D (min. 84), y nus E (min. 72) (15). Tambien se han descrito loci nus que intervienen en terminacion de la transcripcion.

El gene nus A codifica para el producto proteico Nus A que junto con Rho constituyen los dos factores de terminacion transcripcional mas estudiados. La proteina Nus A tiene distinta

especificidad de sitio que Rho (16,17). Dentro del operon PR del fago lambda, la proteina Nus A parece actuar en la señal tR2 situada despues del sitio dependiente de Rho denominado tR1. En algunos sitios, Nus A y Rho actuan conjuntamente para efectuar una terminacion eficiente (18).

Actualmente, se cuenta con evidencias que muestran una interaccion entre Nus A y la RNA-polimerasa. La subunidad sigma de la RNA-pol (proteina necesaria para que ocurra iniciacion de la transcripcion especifica) es capaz de desplazar a la proteina Nus A de un complejo 'core'-Nus A (El 'core' es el complejo proteico constituido por todas las subunidades de la RNA-pol excepto la subunidad sigma) para regenerar la holoenzima capaz de iniciar la transcripcion. Por lo tanto, la proteina Nus A posiblemente actue en el ciclo de la transcripcion como una subunidad de terminacion transcripcional de la RNA-polimerasa (19).

La mutacion nus E 71 es un alelo del gene rps J (situado en el minuto 72), que codifica para la proteina ribosomal S10 (20). El aislamiento de una mutacion en una proteina ribosomal que afecta la actividad de pN es consistente con la interferencia de la traduccion en la terminacion de la transcripcion.

Se han descrito por lo menos tres mecanismos diferentes por medio de los cuales se regula la terminacion de la transcripcion: el primero destaca la influencia de la traduccion sobre la terminacion transcripcional, este mecanismo explica como la funcionalidad de algunos terminadores se encuentra enmascarada

por el proceso de traducción. Este enmascaramiento ocurre por el bloqueo de la acción de Rho (proteína que para funcionar requiere de la interacción con RNA) ejercido por los ribosomas cuando un operon se transcribe. Si los ribosomas se liberan del RNA al detenerse el alargamiento de la cadena polipeptídica, y antes de una señal de terminación de la transcripción, Rho es capaz de actuar sobre la RNA-pol permitiendo que ocurra la terminación de la transcripción dependiente de Rho (2).

El segundo mecanismo se refiere al control por atenuación, este mecanismo se presenta en operones para la síntesis de aminoácidos. Por ejemplo; la transcripción que se inicia en el promotor del operon para triptófano se regula (por atenuación) en un sitio de terminación transcripcional que precede a los genes estructurales del operon (sitio atenuador), esta regulación es afectada por los niveles de tRNA^{trp} presentes en la célula (21).

El tercer mecanismo es el de regulación por antiterminación. En este caso la proteína N del fago lambda (o de fagos lambdoides en gral.) actúa como antiterminador y permite a la RNA-pol transcribir a través de una variedad de señales de terminación que pueden ser dependientes o independientes de Rho (1).

Así mismo, se han descrito otros sistemas en los cuales la regulación a nivel de la terminación transcripcional tiene un papel importante. Evidencias recientes muestran que una proteína de 63 aminoácidos, producto del gene *rop* regula negativamente el

numero de copias de plasmidos de la familia Col E 1. Rop afecta la transcripcion del 'iniciador' en dos formas: Estimulando la terminacion transcripcional en el nucleotido 220 e incrementando la habilidad del RNA 1 de inhibir el procesamiento del 'iniciador' por RNAasa H (22). Por otro lado, se ha reportado que los productos de los genes *sfr A* y *sfr B* de *E. coli* sean factores de control transcripcional y en particular se propone que el producto de *sfr B* actue como un antiterminador transcripcional de varios operones que codifican para componentes de la envoltura celular (23).

Tambien se ha determinado que en *E. coli* el 3'5'-adenosina monofosfato ciclico (AMPC) y su proteina receptora (CAP) estan involucrados en el control de la iniciacion de la transcripcion de operones catabolicos. Sin embargo, se ha encontrado que el complejo AMPC-CAP tambien actua como modulador de la polaridad en unidades transcripcionales policistronicas, habiendo una relacion funcional entre este complejo y Rho. El complejo AMPC-CAP reduce la polaridad interfiriendo con terminacion transcripcional prematura (24). Otro sistema en donde ocurre antiterminacion en *E. coli* se encuentra en la region control del operon *rrn G* en donde la antiterminacion evita la polaridad (25).

Dada la complejidad que muestra la terminacion transcripcional y tratando de averiguar algo mas sobre este proceso, el objetivo de este trabajo consistio en la identificacion de factores bacterianos distintos a Rho que esten involucrados en el proceso de terminacion transcripcional en el

sitio tI. El terminador tI es una señal Rho independiente (27), la cual termina el RNA transcrito que proviene del promotor P_I en el bacteriofago lambda. El aislamiento y caracterización de mutantes bacterianas de E. coli deficientes en esta función, fue posible utilizando el sistema plasmidico descrito en la figura 2, en el cual la señal de terminación tI del fago lambda regula la expresión del gene gal K (27).

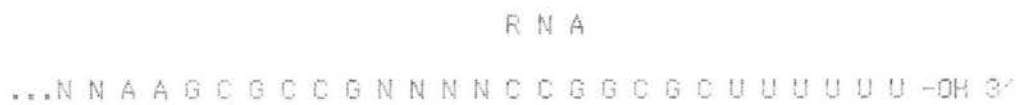
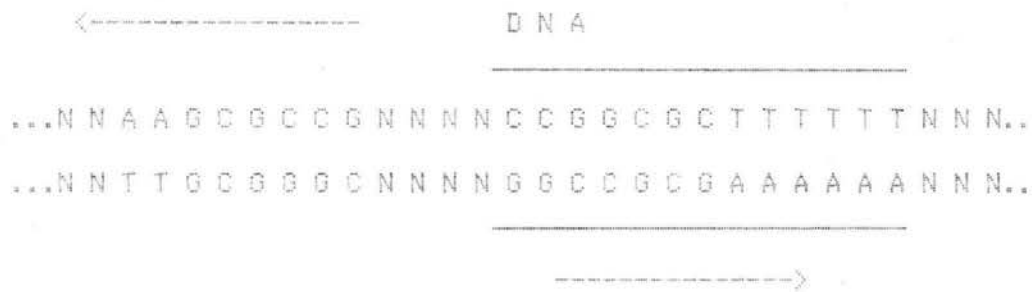


FIGURA A. Estructura secundaria de "tallo-asa" que presenta el RNA en el extremo 3'-OH en las señales de terminación transcripcional.

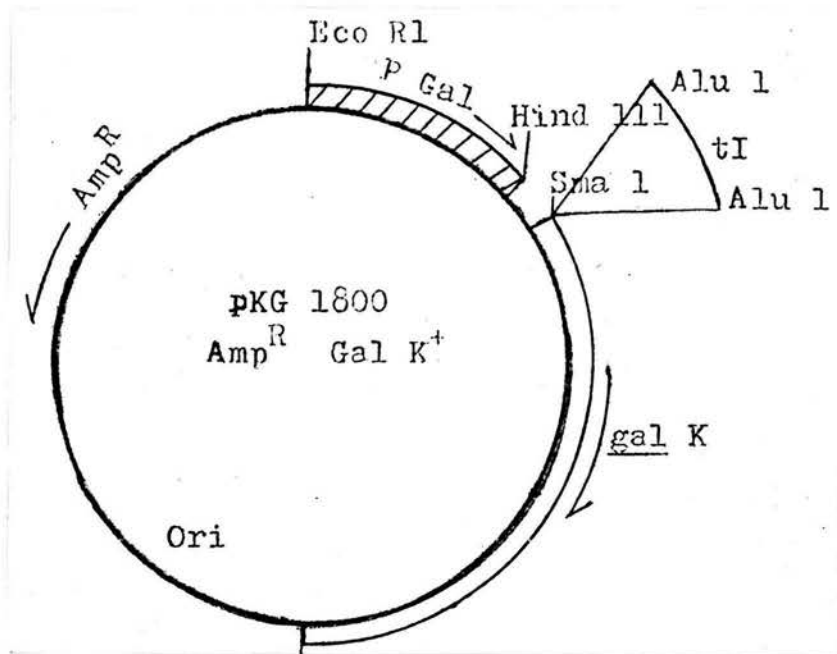


FIGURA B . El plasmido vector pKG 1800 contiene el promotor para el operon gal (P Gal) insertado entre los sitios Eco RI y Hind III del plasmido progenitor pK01. P Gal controla la expresion del gene gal K. El terminator tI del fago lambda (fragmento de 243 pares de bases) fue clonado en el sitio Sma I y su eficiencia en terminacion transcripcional se determina por un ensayo de cuantificacion de la expresion de Galactocinasa (30).

MATERIAL Y METODOS.

CEPAS .- En la tabla A se encuentran descritas las cepas bacterianas utilizadas. En la tabla B los bacteriofagos utilizados así como las mutaciones relevantes en este trabajo.

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS .- Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes: medio LB (triptona 10 g extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g aforado a un litro con agua destilada). En el caso de la preparación de cajas se adicionaron 15 g de agar; LB-amp: al medio LB se le adiciono 25 ug/ml de ampicilina o 10 ug/ml de tetraciclina o el antibiotico adecuado, a las concentraciones indicadas en los experimentos previa esterilizacion por filtracion; medio t0 (bactotripton 10 g, NaCl 2.5 g, 2 ml de NaOH al 2%, agar 10 g por litro); medio t0 suave (triptona 10 g, NaCl 2.5 g, 2 ml de NaOH al 2% y agar 6 g por litro); medio TB-D (triptona 10 g, NaCl 5 g, NaOH al 2% 2.5 ml por litro, despues de ser esterilizado se adiciono maltosa a una concentracion final de 0.2%); medio tet-C (triptona 10 g, NaCl 5 g, agar 11 g, cloruro de 2, 3, 5, trifeniltetrazolium al 1% 2.5 ml, en un litro de agua, despues de ser esterilizado se añadieron 50 ml de D-galactosa al 20% esterilizada por filtracion); medio SM (NaCl 5.85 g, gelatina 0.5 g, agua 480.5 ml ajustando el pH a 5.4, despues de esterilizar, 4.5 ml de Tris 1 M pH 7 y 2.5 ml de MgSO4 1 M). Solucion de citrato de sodio (citrato trisodico 0.02 M pH 8.5 en agua bidestilada). Medio M9 (Fosfato acido de sodio 6 g, fosfato acido de potasio 3 g, NaCl

TABLA A

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS.

CEPAS	CARACTERISTICAS GENETICAS	FUENTE
SA1943	F ⁻ sup ^o rps L str ^r his ⁻ gal K ambar	
AB1157	F ⁻ thr ⁻ pro ⁻ his ⁻ arg ⁻ leu ⁻ lac ⁻ xil ⁻ mtl ⁻ str ^r thi ⁻ T6 l ^{r s}	ENCB
CA8000	Hfr H str ^s thi ⁻	CINVESTAV
603 CSH 67	Hfr C trp ^r thi ⁻	CINVESTAV
730 SA1943	SA1943 nus A ⁻	CINVESTAV
B CA8000	CA8000 gal K ⁻	Este Trabajo
B 603	603 CSH 67 gal K ⁻	Este Trabajo
SA1943 rec A ⁻	SA1943 rec A ⁻	CINVESTAV
SA1943 nus A ⁻	SA1943 nus A ⁻	CINVESTAV
Q1	sup E, supresor de mutaciones ambar	CINVESTAV
C600	F ⁻ thi-1 leu B6 thr-1 lac Y1 ton A21 sup E 44 l ⁻	CINVESTAV

TABLA B
BACTERIOFAGOS UTILIZADOS

NOMBRE	CARACTERISTICAS	FUENTE
lcI857	Represor termosensible de lambda	Sussman y Jacob, 1962.
lnin 5	Delecion de 5.4% de DNA situada entre los genes P y Q.	Court y Sato, 1969.
lgal8	Sustitucion de la region b2 de lambda por el operon gal de E. coli.	Feiss et al., 1972.
lbiol1	Sustitucion del operon bio que elimina los genes int, xis, red y gam de lambda.	Manly et al., 1969.
* lN	Mutacion en la proteina N, que permite que el fago se desarrolle en una cepa nus A ⁻ .	Vaca, S. y Guarneros, G. 1985.
* lN nutL 44 i4	Mutacion en la region nutL que no permite la prolongacion del mensaje del promotor pL de lambda * N -igual al fago anterior.	Sosa, L. y Vaca, S.
P1 clri00 clm	Fago de transduccion generalizada, que confiere resistencia a cloramfenicol. Represor termosensible.	CINVESTAV

0.5 g, cloruro de amonio 1 g, adicionar 10 ml de cloruro de calcio 0.01 M, 1 ml de sulfato de magnesio heptahidratado 1 M, 10 ml de una fuente de carbono al 20% (azucar o glicerol) por cada lt. Las vitaminas (tiamina) se agregan a una concentracion final de 1 ug/ml y los aminoacidos a 80 ug/ml en la forma D,L y a 40 ug/ml en la forma L); cajas de agar minimo (todas las cajas son preparadas para obtener una concentracion final por lt, agar minimo Difco 15 g, sales de fosato acido de potasio 10.5 g, sulfato de amonio 1 g, citrato de sodio dihidratado 0.5 g, sulfato de magnesio heptahidratado a una concentracion final de 0.02 g/100 ml, previamente esterilizado por filtracion, vitamina E1 (tiamina) se agregan 0.5 ml de una solucion stock al 1%, aminoacidos a una concentracion final de 0.04 mg/ml, de azucar se agregan 10 ml de una solucion stock al 20%, antibioticos requeridos a concentracion necesaria. La solucion salina y el agar se prepararon por separado y se esterilizaron a 15 lbs/in² durante 15 minutos. El Mg y la fuente de carbono se preparan y se esterilizan separadamente. Normalmente 40 ug/ml de D,L-aminoacidos (o 20 ug/ml de L-aminoacidos) son suficientes. Las vitaminas se adicionan a las sales despues de autoclavar, su requerimiento es de pequenas cantidades (1 ug/ml); medio Mac Conkey-galactosa (Mac C), se requieren 40 g de agar base Bacto-Mac Conkey y 950 ml de agua. Despues de esterilizar por autoclave se agregan 50 ml de una solucion de galactosa al 20%. Para agar top Mac Conkey, usar 20 g de agar base por lt; medio M63 (para preparar 4 lt a 10X: fosfato monobasico de potasio 120 g, fosfato dibasico de potasio 280 g, sulfato de amonio 80 g y

sulfato ferroso 20 ml de una solución de 1 mg/ml de concentración. No es necesario esterilizar; solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM a pH 8, Tris-HCl 25 mM a pH 8, Tris-HCl 0.562 M Tris-OH 0.438 M); solución II (NaOH 0.2 N y SDS al 1%); solución III (acetato de potasio 3 M a pH 4.8, este se prepara con 60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua).

MUTAGENESIS CON NITROSO-GUANIDINA.

Un cultivo bacteriano de la cepa a mutagenizar se creció durante toda la noche, se tomaron 2 ml y se inocularon en 20 ml de medio de cultivo. Se incubó el cultivo hasta alcanzar la fase logarítmica ($Do. 600 = 1$). A 10 tubos de centrifuga se les añadió 50 μ l de una solución de nitroso-guanidina a una concentración de 2.5 mg/ml, disuelta en etanol al 95%. Se inocularon 2 ml de las células en cada tubo y se incubaron 10 min a 37°C. El cultivo se centrifugó hasta la formación de una pastilla y se lavó una vez con M63. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 5 ml de LB e incubó durante toda la noche. Se espatularon las bacterias sobrevivientes en medio de cultivo selectivo (medio Mac Conkey Galactosa amp).

METODO DE "CURACION" DE PLASMIDOS CON NARANJA DE ACRIDINA.

De una dilución de un cultivo bacteriano de 0.00005, crecido durante toda la noche se tomaron 0.1 ml y se añadieron 5 ml de LB conteniendo la concentración necesaria de naranja de acridina. Estos tubos se incubaron en la oscuridad a 37°C durante toda la

noche. Al día siguiente se espatularon diluciones del cultivo y se incubaron a 37°C. Al otro día se hizo una replica de las colonias crecidas, para probarles producción de B-lactamasa.

IDENTIFICACION DE B-LACTAMASA.

En cajas petri conteniendo medio LB con ampicilina 50 ug/ml se coloco un tapiz de bacterias sensibles a este antibiotico. Sobre este tapiz se picaron las colonias a las cuales se les queria determinar la presencia del plasmido que confiere resistencia a la ampicilina (pKG1800). Las mismas colonias tambien se replicaron en cajas con LB unicamente. Al día siguiente se observo el crecimiento de las colonias en las cajas con y sin ampicilina. Aquellas colonias que presentaron un "halo" de crecimiento de bacterias sensibles conservaban el plasmido, ya que al poder degradar la ampicilina, permiten el crecimiento de la cepa sensible. Las cepas que no tuvieron plasmido no crecieron el medio con antibiotico.

METODO RAPIDO PARA AISLAMIENTO DE PLASMIDOS.

Las bacterias conteniendo el plasmido por extraer, se crecieron en 5 ml de medio LB-ampicilina (a una concentración de 50 ug/ml) durante toda la noche. Se centrifugaron 1.5 ml del cultivo en una centrifuga ependorff (10-15 Krpm) durante 3 min. y el sobrenadante se decanto. A la pastilla se le añadieron 1.5 ml mas del cultivo, se centrifugo igual que en el paso anterior y se resuspendio la pastilla en 200 ul de solución I mas 20 ul de una solución de lizosima a una concentración de 2 mg/ml. La

suspension se colocó en hielo durante 30 min. y después se agregaron 400 μ l de solución II, la preparación se mezcló cuidadosamente por inversión y se dejó en hielo durante 5 min. después de los cuales se agregaron 300 μ l de la solución III mezclándose por inversión e incubando durante 60 min. Las muestras se centrifugaron durante 15 min en una centrifuga eppendorf y se transfirió el sobrenadante (aproximadamente 750 μ l) a un tubo nuevo. Se agregaron 450 μ l de isopropanol y el tubo se dejó en hielo durante 30-60 min. Después se centrifugó en una centrifuga eppendorf durante 10 min y se decantó el alcohol. La pastilla se resuspendió aproximadamente en 500 μ l de tris-EDTA (T-E) y se añadió un volumen de fenol saturado con Tris el cual migra hacia la parte inferior del tubo. Se centrifugó en eppendorf durante 3 min, el sobrenadante se pasó a tubo limpio y a la pastilla se le agregó nuevamente T-E, con el objeto de rescatar todo el DNA que quedó en la fase de fenol. Se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó 3 min en la centrifuga eppendorf, el cloroformo quedó en la parte inferior y se sacó cuidadosamente, se repitió este paso agregando un volumen de cloroformo:etanol. El DNA se precipitó agregando 2.5 volúmenes de etanol y se dejó en hielo seco 30 min (o bien a -20°C toda la noche). El DNA precipitado formó una pastilla y esta se secó. La pastilla se resuspendió en 100 μ l de T-E incubando a 58°C durante 5 min.

GELES DE AGAROSA.

Se preparo una solucion al 1% de agarosa, usando como regulador Tris 0.04 M EDTA 0.002 M. La agarosa se calento hasta su disolucion y se vacio en la camara en donde se llevo a cabo la electroforesis.

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES.

Se tomaron 5 ml de un cultivo bacteriano de la cepa de interes crecido durante toda la noche para inocular 50 ml de medio de cultivo LB. Este se crecio hasta una densidad optica de 0.4 ($D_{600} = 0.4$), posteriormente se centrifugo el cultivo a 5 Krpm durante 10 min a 4°C, se desecho el sobrenadante y la pastilla se resuspendio cuidadosamente en aproximadamente 20 ul de solucion MOPS I (acido morfolinopropanesulfonico 50 mM pH 7 y RbCl 10 mM). La preparacion se incubo en hielo durante 30 min y despues se centrifugo a 5 Krpm durante 10 min a 4°C. Se desecho el sobrenadante y la pastilla se resuspendio en 2 ml de MOPS II (MOPS 100 mM pH 6.5, cloruro de calcio 70 mM y cloruro de rubidio 10 mM).

TRANSFORMACION BACTERIANA (cloruro de rubidio).

La transformacion se llevo a cabo agregando 10 ul de DNA y 4 ul de DMSO (dimetil sulfoxido) a 250 ul de las celulas competentes en tubos de plastico. Las celulas con el DNA se incubaron durante 5 min a 58°C y se colocaron en hielo por 30 min. Posteriormente, las celulas se sometieron a un choque termico a 42°C durante 50 seg, se dejaron en hielo durante 30 min

y se les agregaron 3 ml de LB. Las muestras se incubaron de 30-45 min a 37°C con agitacion y se espatularon alicuotas de 200 ul en cajas conteniendo medios de cultivo con el antibiotico adecuado (amp 50 ug/ml).

TRANSFORMACION BACTERIANA (cloruro de calcio).

Se inocularon 100 ml de medio de cultivo LB con 1 ml de un cultivo bacteriano de la cepa a transformar crecido durante toda la noche (en un matraz de 500 ml). Se crecieron las celulas en agitacion vigorosa a 37°C hasta una cantidad aproximada de 5×10^7 celulas/ml (generalmente de 2-4 hrs). Las celulas se trasladaron a hielo por 10 min y se centrifugaron a 4 Krpm durante 5 min a 4°C. Se desecho el sobrenadante y se resuspendio la pastilla en la mitad del volumen original, en una solucion esteril de cloruro de calcio 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8. La muestra se coloco en hielo por 15 min y se centrifugo a 4 Krpm durante 5 min a 4°C. Se desecho el sobrenadante y la pastilla se resuspendio en 1/15 del volumen original en solucion esteril de cloruro de calcio 50 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8. Se colocaron alicuotas de 0.2 ml en tubos preenfriados y se almacenaron las celulas de 12-24 hrs a 4°C. A las celulas obtenidas se agrego DNA y la mezcla se incubo en hielo durante 30 min, despues de esto, se sometieron a un choque termico (2 min a 42°C) y se les agrego 1 ml de LB a cada uno de los tubos, los cuales se incubaron a 37°C, durante 30 min sin agitar. Despues de este tiempo, las celulas se espatularon en medios de cultivo Mac Conkey galactosa amp y se incubaron a 42°C.

+

CRECIMIENTO DE CEPAS rec A⁺ EN PRESENCIA DE NITROFURANTOINA.

Se crecieron mediante replica o bien mediante estria las colonias bacterianas a las cuales se les queria analizar el genotipo rec A⁻. Este crecimiento se llevo a cabo en cajas con medio LB conteniendo Nitrofurantoina a una concentracion de 5 ug/ml (o a la concentracion indicada en cada experimento) y en medio LB solo. Las bacterias se incubaron a 37°C durante una noche, las colonias que crecieron en el medio con nitrofurantoina fueron identificadas como rec A⁺ y las que no lo hicieron rec A⁻.

TRANSDUCCION GENETICA GENERALIZADA MEDIANTE EL BACTERIOFAGO P1.

Esta transduccion se llevo a cabo utilizando el bacteriofago P1 clr 100 clm (posee transposon que confiere resistencia a cloramfenicol) y cualquiera de los siguientes protocolos:

Protocolo I: Se crecio la cepa donadora en medio LB-cloruro de calcio 5mM, a una densidad de 10^8 celulas /ml. Se infecto este cultivo con el bacteriofago P1 a una multiplicidad de infeccion de 0.01. Se agito a 37°C hasta observar lisis (de 2-3 hrs) y se agregaron de 5-10 gotas de cloroformo. Se centrifugo el cultivo para obtener la pastilla de celulas y se titulo el sobrenadante que contiene a los bacteriofagos transductores.

Protocolo II: (a) Obtencion de lisogenas de P1 a 30°C. Estas se obtuvieron goteando el bacteriofago P1 sobre un tapiz de la cepa donadora. Utilizando LB-cloramfenicol (a una concentracion por caja de 12.5 ug/ml), se crecieron las colonias bacterianas lisogenas obtenidas a 30°C, se indujo la lisis de la bacteria por el bacteriofago, incubando a 30°C hasta alcanzar una

8

concentracion de celulas de aproximadamente 2×10^8 y posteriormente se cambio la incubacion a 40°C durante 35 min con buena aereacion. Despues de este tiempo se incubo nuevamente la bacteria, a 37°C en agitacion durante 1 hr. En este momento se agrego cloroformo (5-10 gotas) y se centrifugo el cultivo separandose el sobrenadante que lleva el fago.

(b) Transduccion: Se crecio la cepa receptora en 10 ml de medio LB con cloruro de calcio 5 mM y sulfato de magnesio 10 mM, hasta una concentracion celular de aproximadamente 10^8 celulas/ml. Se centrifugo el cultivo bacteriano y se resuspendio la pastilla en 10 ml de cloruro de calcio 5 mM y sulfato de magnesio 10 mM. Se llevaron a cabo infecciones por duplicado de la siguiente manera:

Tubo-----	1	2	3	4	5
cepa receptora-	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	-----	0.1 ml
lisado-----	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	-----
	de una dilucion:				
	0	0.1	0.01	0.001	-----

Se incubo durante 20 min a 37°C sin agitacion, se agregaron a cada tubo 0.2 ml de citrato de sodio 1 M, se vacio con agar suave inmediatamente a cajas con medio selectivo y se incubo a 42°C durante 24-48 hrs.

RESULTADOS.

Debido a nuestro interes por identificar y caracterizar factores bacterianos que participen en la terminacion de la transcripcion en el sitio tI, se decidio aislar mutantes bacterianas deficientes en promover esta funcion. Como primer paso se realizo una caracterizacion general de las cepas a utilizar.

I. Determinacion del genotipo y fenotipo de las cepas utilizadas para el aislamiento de mutantes deficientes en terminacion de la transcripcion .

Previo al aislamiento de las cepas bacterianas mutantes, el primer paso de este trabajo consistio en corroborar las características geneticas de las cepas de *Escherichia coli* a utilizar asi como el establecimiento de las condiciones que permitieran observar el proceso de terminacion transcripcional en el sitio tI. En los resultados presentados en la tabla 1 se observa que algunas de las cepas probadas son capaces de utilizar Galactosa (colonias rojas:R), mientras que otras son incapaces de metabolizar este azucar (colonias blancas:B). Los resultados obtenidos estan de acuerdo con lo esperado; cuando el plasmido pKG1800 presenta la region tI del fago lambda, no se expresa el gene gal K debido a que ocurre terminacion transcripcional en el sitio tI (colonias blancas). En ausencia del terminador tI, el gene gal K del plasmido se expresa obteniendose colonias rojas en el medio Mac Conkey-galactosa. Tambien puede observarse que en el

+ -

caso de la cepa SA1943 rec A⁺ gal K⁻ que contiene el plasmido pKG1800tI se obtienen colonias blancas a temperaturas altas, sin embargo, siempre aparece un fondo de colonias rojas, que posiblemente se generan por una recombinación mediada por rec A entre el genoma bacteriano y el plasmido pKG1800tI. Por esta razón, se decidió utilizar en lo sucesivo a la cepa SA1943 gal K⁻ rec A⁻ como progenitora para la obtención de mutantes bacterianas deficientes en terminación (colonias rojas en medio MacConkey-galactosa). Así mismo, se decidió trabajar a la temperatura de 42°C, ya que es la condición adecuada para el efecto de terminación de la transcripción en el sitio tI.

Por lo que respecta al análisis del fenotipo producido por la mutación rec A, se utilizaron el bacteriofago Ie1857 como control y el fago Igal8 bio11 cuyo crecimiento ocurre en cepas rec A⁺ y no en cepas rec A⁻. El fago Igal8 bio11 tiene sustituida la región b2 por el operón bacteriano gal y los genes int, xis, red y gam por los genes bacterianos del operón bio, estos últimos son necesarios para que el fago crezca en cepas rec A⁻. Para el genotipo rec A^{+/-} también se obtuvieron los resultados esperados.

Así mismo en la cepa SA1943 gal K⁻ nus A⁻ pKG1800tI no ocurrió terminación de la transcripción posiblemente debido a que la proteína Nus A está mutada y se ha reportado que esta puede actuar como factor de terminación transcripcional (19, 31), por lo tanto, se obtienen colonias rojas a 42°C aunque a 37°C se obtienen algunas colonias blancas; esto puede deberse a la termosensibilidad de la mutación nus A1 (15) observándose mejor el efecto de la mutación a 40°C.

Cepa	gal K	Plasmido	Crecimiento en *			lcI857	lgal8bio11
			34°C	37°C	42°C		
rec A	-					+	-
rec A	+					+	-
rec A	+	pKG1800	R	R	R	+	+
rec A	+	pKG1800tI	R	RB	RB	+	+
rec A	-	pKG1800tI	B	B	B	+	-
nus A1		pKG1800	R	R	R		
nus A1		pKG1800tI	R	RB	RB		

Tabla 1. CARACTERIZACION DE CEPAS DE E. coli UTILIZADAS

+ crecimiento

- ausencia de crecimiento

* crecimiento durante 20 hrs

R colonias rojas

B colonias blancas

RB colonias rojas y blancas.

Con los experimentos hasta aqui descritos, se establecieron las condiciones para distinguir con facilidad la terminacion de la transcripcion en el sistema utilizado en este trabajo. La temperatura elegida fue de 42°C, y un periodo de incubacion de 18 a 20 hrs y en la cepa rec A⁻.

II Aislamiento de mutantes deficientes en terminacion (det).

Con el objeto de aislar las mutantes bacterianas deficientes en terminacion, se mutagenizaron independientemente, inoculos de la cepa SA1943 rec A⁻ pKG1800tI contenidos en siete tubos. Se uso un tubo control conteniendo inoculo de esta cepa sin mutagenizar. La mutagenesis se llevo a cabo utilizando nitrosoguanidina de acuerdo al metodo descrito en materiales y metodos.

Los candidatos mutantes se detectaron como colonias rojas en el medio Mac Conkey-galactosa (Mac C), esta coloracion se observa debido a que la cepa es capaz de metabolizar la galactosa presente en el medio. Esta capacidad, como se demuestra mas adelante, se debe a la ausencia de terminacion en el sitio tI, con la consecuente expresion del gene gal K.

La eficiencia de obtencion de mutantes se presenta en la tabla 2, en donde se observa que la aparicion de mutantes se ve aumentada alrededor de 70 veces. La diferencia entre las frecuencias de aparicion de colonias rojas nos permitio concluir que el proceso de mutagenesis funciono. Cabe hacer notar que las bacterias sobrevivientes al tratamiento mutagenico fueron crecidas durante una noche y posteriormente fueron cuantificadas.

SA1943 rec A pKG1800tI Tubo No.-	Porcentaje de colonias rojas (mutantes)
1	0.4
2	0.3
3	0.9
4	0.6
5	0.4
6	1.9
7	0.7
control sin mutageno	0.01

Tabla 2. EFICIENCIA DE OBTENCION DE MUTANTES CAPACES DE METABOLIZAR GALACTOSA. La cepa SA1943 rec A pKG1800tI fue mutagenizada con nitrosoguanidina (2.5 mg/ml). La seleccion de mutantes se llevo a cabo en medio de cultivo Mac Conkey-galactosa a 42°C despues de permitir el crecimiento por 18 hrs.

Debido a que utilizando el procedimiento anterior tambien es posible aislar mutantes en el plasmido que produzcan un fenotipo Gal⁺, consideramos adecuado mutagenizar a la cepa SA1943 rec A⁻ gal K⁻ (utilizando nitrosoguanidina) y posteriormente transformar a esta cepa con el plasmido pKG1800tI. Debido a que la cepa no llevaba el plasmido pKG1800tI al ser mutagenizada, se eliminaba la posibilidad de que alguna mutacion en el plasmido produjera el fenotipo buscado (colonias rojas: Gal⁺). Despues de transformar con el plasmido pKG1800tI silvestre a las bacterias mutagenizadas, solo uno de los transformantes aislados produjo colonias rojas (R) en medio Mac Conkey-galactosa a 42°C despues de 18 hrs de incubacion. A este candidato mutante se le denomino 2-1.

III Caracterizacion de los Candidatos Deficientes en Terminacion.

a. Una vez aislados siete grupos de mutantes independientes (fenotipo Gal⁺), se procedio a caracterizarlos geneticamente con respecto a los marcadores: rec y nus. Para lograr este objetivo se utilizaron los bacteriofagos lc1857, 1N*, lgal8bio11, 1nin5. El bacteriofago lc1857 se utilizo como control de crecimiento de un bacteriofago silvestre, produce placas claras sobre un tapiz de bacterias a 42°C y no crece en cepas nus A⁻ rec A⁻. El bacteriofago 1N*, presenta una mutacion en el gene que codifica para la proteina N (proteina antiterminadora), de manera que no requiere a Nus A para la funcion de antiterminacion, crece en cepas tanto nus A⁺ como nus A⁻ (Sosa y Vaca., com. pers.). Por lo

que respecta al fago lbio11gal8 como ya se menciona, no crece en cepas rec A⁻ (38 y 39). El bacteriofago lnin5 crece en cepas nus A⁻, ya que este fago presenta una deleción entre los genes P y Q que elimina terminadores de la transcripción, haciéndose su desarrollo independiente de las proteínas Nus A y N (37).

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos al analizar el desarrollo de los fagos señalados en los siete grupos de mutantes aisladas. Por los resultados obtenidos, las mutantes probadas se pueden clasificar en tres grupos:

(A) Los candidatos 1, 3, 4, 5 y 6 presentan un genotipo: nus⁺ rec A⁺. (B) Candidatos 7 (7-1 y 7-5) y 8 presentan un genotipo: nus⁻. (C) Los candidatos del grupo (7-2, 7-3, 7-4 y 7-6) presentan un genotipo nus⁺ rec A⁻.

Cabe señalar que en algunos grupos se revirtió el genotipo rec A, ya que se partió de una cepa rec A⁻. Los candidatos nus⁺ rec A⁻ resultaron ser muy interesantes debido a su potencialidad para identificar nuevos factores que participen en la función de tI. Ya que los candidatos previamente mencionados fueron obtenidos por mutagenesis tanto del genoma bacteriano como del plasmido, fue necesario poder discernir entre el hecho de que la mutación se encontrara en el plasmido (originándose expresión de gal K y por lo tanto la obtención de colonias rojas) o bien en el genoma de la bacteria (conduciendo también a la expresión del gene gal K y produciendo colonias rojas). Se procedió a seleccionar de entre todos los grupos a tres candidatos que representan los tres genotipos obtenidos y demostrar que en cada

Candidatos SA1943	lcI857	[*] 1N	lgal8bio11	lnin5	genotipo probable
1-1 al 1-5	+	+	+	+	+ + nus rec A
3-1 al 3-6	+	+	+	+	+ + nus rec A
4-1 al 4-4	+	+	+	+	+ + nus rec A
5-1 al 5-4	+	+	+	+	+ + nus rec A
6-1 al 6-2	+	+	+	+	+ + nus rec A
7-1 y 7-5	-	+	-	+	- nus
7-2, 7-3 7-4 y 7-6	+	+	-	+	+ nus rec A
8-1 al 8-3	-	+	-	+	- nus
Controles					
rec A ⁻ pKG1800tI	+		-		
rec A ⁺ pKG1800tI	+	+	+	+	
nus A ⁻ pKG1800tI	+	+		+	

Tabla 3. CARACTERIZACION DE LOS CANDIDATOS MUTANTES CON RESPECTO
^{*}
A LOS FENOTIPOS Nus Y Rec A. Los fagos lambdoides lcI857, 1N ,
lgal8bio11 y lnin5 fueron crecidos por gota sobre las cepas
SA1943 pKG1800tI previamente seleccionadas asi como sobre las
cepas controles. La temperatura de incubacion fue de 42°C.

una de ellas la alteracion responsable del fenotipo Gal⁺ se localizara en el genoma bacteriano. Los candidatos seleccionados fueron los siguientes: 3-1 nus⁺ rec A⁺, 7-1 nus⁻, 7-6 nus⁺ rec A⁻. A los candidatos seleccionados se les elimino el plasmido pKG1800tI mediante el protocolo de "curacion" de plasmidos descrito por Miller (seccion de material y metodos). Se llevo a cabo este tipo de experimentos como ya se menciona, con el objeto de localizar la mutacion en el plasmido o en el genoma de la bacteria. En el caso de que la mutacion se encontrara en el plasmido, se obtendrian colonias blancas en el medio Mac Conkey-galactosa ya que el terminador tI estaria funcionando. Si la mutacion se encontrara en el genoma bacteriano, resultarían colonias rojas. En la tabla 4 se presenta la caracterizacion de los candidatos del curados del plasmido pKG1800tI. La prueba para sintesis de B-lactamasa se llevo a cabo mediante la replica de las colonias problema en medio de cultivo con y sin ampicilina. Se seleccionaron las colonias curadas debido a que no crecen en el medio de cultivo con el antibiotico y se analizo su capacidad para sintetizar B-lactamasa asi como su fenotipo en medio Mac Conkey-galactosa. Los resultados obtenidos muestran que la coloracion roja en el medio Mac Conkey-galactosa depende de la presencia del plasmido pKG1800tI, característica esperada para el tipo de mutantes que se desean aislar. Despues de esta "curacion" y de analizar el fenotipo de los candidatos se transformaron estos con el plasmido pKG1800tI silvestre, o sea, no sometido a la accion del mutageno y su caracterizacion esta en la fig. 1.

Candidatos	Naranja de Acridina ug/ml *		B-lactamasa	Coloracion en medio Mac Conkey galactosa
SA1943 gal K ⁻				
3-1 nus ⁺ rec A ⁺	25		-	B
7-6 nus ⁺ rec A ⁻	30		-	B
7-1 nus ⁻ rec A ⁻	50		-	B

Tabla 4. CARACTERIZACION DE LOS CANDIDATOS del CURADOS DEL PLASMIDO pKG1800tI. * Concentracion de Naranja de Acridina a la cual fue posible curar el plasmido pKG1800tI. Para la prueba de la B-lactamasa el signo - significa que no se detecto el plasmido. La incubacion medio de cultivo Mac Conkey-galactosa para determinar el fenotipo Gal se llevo a cabo a 42°C durante 18 hrs. B representa colonias blancas.

Previo a la transformacion de los candidatos det 3-1, 7-6 y 7-1 curados, se aislo el plasmido pKG1800tI y se sometio a electroforesis en gel de agarosa junto con otros plasmidos (ver fig .1). De la observacion de la fig. 1 se eligio el plasmido pKG1800tI del carril 5, ya que este, presento una definicion de bandeado adecuada.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos despues de transformar a los candidatos 3-1, 7-6 y 7-1 con el plasmido pKG1800tI. Los resultados obtenidos permiten concluir que la mutacion responsable del fenotipo de utilizacion de Galactosa, es decir, ausencia de terminacion en tI con la consecuente expresion del gene gal K, se encuentra en el genoma bacteriano.

Por otra parte se analizaron nuevamente los fenotipos Nus y Rec A de los candidatos mutantes, curados y transformados con el objeto de comprobar que siguieran conservando el fenotipo anteriormente determinado despues de la serie de manipulaciones que se llevaron a cabo. En este exeperimento, se analizo adicionalmente el desarrollo del fago IN nut L el cual no crece exclusivamente en una cepa rec A debido a que no se expresan los genes red y gam de lambda. Este fago IN nut L es importante ya que permite diferenciar las cepas nus⁺, con respecto al marcador genetico rec A⁺ o rec A⁻. Los resultados de este experimento se presentan en la tabla 6. Estos resultados confirman los anteriores. En la tabla 6 se incluye al candidato 2-1.

Por otra parte debido a que el plasmido pKG1800tI no se curo facilmente tanto de los candidatos mutantes como de los controles se procedio a realizar la curacion de los plasmidos incrementando

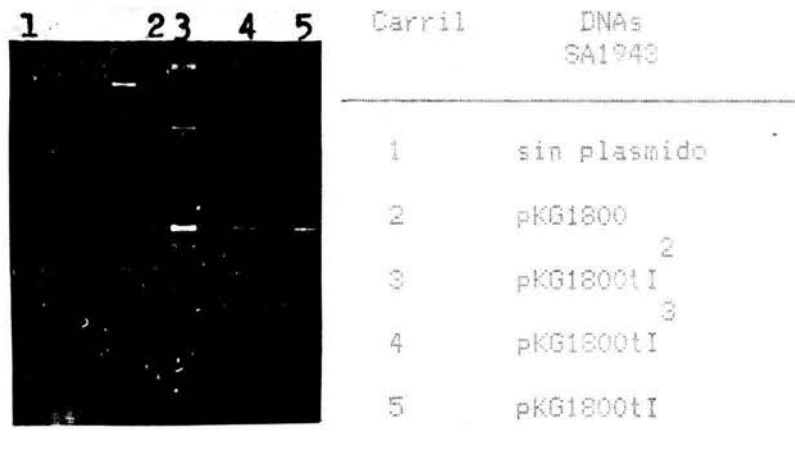


Fig. 1. MIGRACION DEL PLASMIDO pKG1800tI. Se observa el patron de migracion del plasmido pKG1800tI asi como del DNA cromosomal, del plasmido pKG1800 (carece de la region tI), del plasmido pKG1800tI² (tI ; es el terminador tI con una mutacion puntual en la base de la orquilla) y del plasmido pKG1800tI³ (tI ; es tI con una mutacion puntual fuera de la estructura "tallo-asa").

Candidatos SA1943 gal K pKG1800tI	Coloracion de colonias bacterianas en medio Mac Conkey galactosa.
3-1	R
7-6	R
7-1	R
Control rec A	B

Tabla 5 . TRANSFORMACION DE LOS CANDIDATOS det CON EL PLASMIDO pKG1800tI. Los candidatos 3-1, 7-6 y 7-1 fueron transformados con el plasmido pKG1800tI. R representa colonias con coloracion roja y B colonias blancas. La incubacion se llevo a cabo en medio de cultivo Mac Conkey-galactosa con ampicilina durante 18 hrs a 42°C

Candidato	lcI857	lga18bio11	* IN mut L	* IN	FENOTIPO	
SA1943 gal K ⁻					+	+
3-1	+	+	+	+	Nus	Rec A
7-6	+	-	-	+	+	-
2-1	+	+	+	+	Nus	Rec A
- +						
rec A nus A	+	-	-	+		
+ -						
rec A nus A	-	-	+	+		

Tabla 6 . FENOTIPO Nus Y Rec A DE LOS CANDIDATOS det CURADOS Y TRANSFORMADOS. El signo + significa crecimiento del bacteriofago y el signo - significa ausencia de crecimiento de este.

la concentración de naranja de acridina, así como el tiempo de incubación de esta sustancia. En este experimento se llevó a cabo la curación del plásmido pBR322 para establecer una comparación con la frecuencia de curación del plásmido pKG1800tI. También se procedió a curar nuevamente a los candidatos transformados con el plásmido silvestre (no mutagenizado) y candidatos nuevos correspondientes a grupos diferentes: 7-3 nus⁺ rec A⁻; 7-5, 8-1 y 8-3 nus⁻ rec A⁻. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la tabla 7. En esta tabla se pueden observar pequeñas diferencias en la eficiencia de curación de las cepas que contienen diferentes plásmidos, así mismo fue posible obtener curados los candidatos 7-5 y 8-1: nus⁻ rec A⁻. Estos candidatos se transformaron con el plásmido pKG1800tI silvestre para determinar, como en los casos anteriores, si la mutación se encontraba en el genoma bacteriano o en el plásmido. Sin embargo, el candidato 7-5 fue incapaz de crecer después de haber sido transformado. El candidato 8-1 transformado con el plásmido pKG1800tI fue analizado para su capacidad de metabolizar Galactosa. Como se puede observar en la tabla 8, este candidato produce colonias rojas en medio Mac Conkey-galactosa, por lo tanto, la mutación estudiada se encuentra en el genoma de la bacteria como se determinó para las mutantes previamente caracterizadas.

Candidatos SA1943 gal K	Concentracion de naranja de acridina ug/ml	B-lactamasa	Fenotipo Gal	Frecuencia de curacion
7-1	50	-	B	4.4×10^{-2}
3-1	50	-	B	4.04×10^{-2}
7-6	50	-	B	1.06×10^{-2}
7-5	75	-	B	1 colonia
8-1	60	-	B	2.3×10^{-2}
pBR322	50	-	B	7.85×10^{-2}
pKG1800tI	75	-	B	2 colonias
rec A ⁻				
pKG1800tI	75	-	B	8×10^{-2}

Tabla 7. CURACION DE PLASMIDOS CON NARANJA DE ACRIDINA. Para llevar a cabo la curacion de los plasmidos, se utilizaron tiempos de incubacion con naranja de acridina de 48 hrs para todas las cepas excepto candidato 8-1 en donde la incubacion se llevo a cabo durante 72 hrs. En la prueba de la B-lactamasa el signo - implica que no se detecto resistencia a ampicilina conferida por el plasmido. La incubacion en medio de cultivo Mac Conkey-galactosa para determinar el fenotipo Gal, se llevo a cabo 42°C durante 18 hrs. La B representa colonias blancas.

Candidato	Coloracion en medio Mac Conkey-galactosa ampicilina
8-1(tI)	R
SA1943 rec A ⁻	B

Tabla 8. TRANSFORMACION DEL CANDIDATO 8-1 CON EL PLASMIDO pKG1800tI. Fenotipo del candidato 8-1 transformado con el plasmido pKG1800tI. La incubacion se realizo durante 18 hrs a 42°C: R colonias rojas, B colonias blancas.

(A) Determinación del fenotipo Rec A utilizando nitrofurantoina.

Los candidatos mutantes transformados con el plasmido pKG1800tI se sometieron a la acción del antibiótico nitrofurantoina con el fin de determinar el genotipo rec A con este antibiótico. La nitrofurantoina permite el crecimiento de cepas rec A⁺, mientras que inhibe el desarrollo de las cepas rec A⁻ (28). En la tabla 9 y 10 se presentan los resultados obtenidos para los candidatos transformados con el plasmido tI silvestre. Se utilizaron tres concentraciones de nitrofurantoina con el fin de determinar la más adecuada. En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos en el experimento en donde se sometieron a la acción de la nitrofurantoina los candidatos mutantes aislados originalmente, los que fueron curados y transformados otra vez con el plasmido silvestre, con el objeto de determinar su fenotipo Rec A utilizando nitrofurantoina.

De los resultados mostrados en la tabla 10 se confirma que el fenotipo Rec A se conserva en los candidatos después de los tratamientos realizados. En este experimento no fue posible determinar el fenotipo de la cepa 7-1(tra), posteriormente se presenta el resultado correspondiente a esta cepa.

El fenotipo Rec A obtenido utilizando nitrofurantoina fue confirmado por experimentos de desarrollo de bacteriofagos, así mismo, se analizó el fenotipo Nus de la serie de bacterias obtenidas. En la tabla 11 se presentan los resultados del experimento. En este experimento se presentan los tres tipos de candidatos (originales, curados y transformados). Los fagos lambdoides utilizados son los mismos que se describen en el texto

Candidato (pKG1800tI)	Concentracion de Nitrofurantoina (ug/ml)		
	150	165	180
3-1	+	+	+
2-1	+	+	+
7-6	-	-	-
8-1	-	-	-
SA1943 rec A ⁺	+	+	+
SA1943 rec A ⁻	-	-	-

Tabla 9 . DETERMINACION DEL FENOTIPO Rec A UTILIZANDO NITOFURANTOINA. Se usaron diferentes concentraciones de nitrofurantoina para analizar el fenotipo Rec A. El experimento se realizo utilizando los candidatos transformados con el plasmido pKG1800tI. El signo + significa crecimiento, el signo - significa ausencia de crecimiento. La temperatura de incubacion fue de 37°C en la obscuridad.

Candidato	original (ori)	Depas mutantes curado (cur)	transformado (tra)
3-1	+	+	+
7-6	-	-	-
8-1	-	-	-
7-1	-	-	no determinado
2-1	+	(A este candidato no fue necesario curarlo)	
SA1943 rec A ⁺	+		
SA1943 rec A ⁻	-		

Tabla 10 . CARACTERIZACION DEL FENOTIPO Rec A UTILIZANDO NITROFURANTOINA. La concentracion de nitrofurantoina en este experimento fue de 180 ug/ml. En este experimento se comparo el comportamiento de los mutantes originales, curados y transformados con el plasmidoti silvestre.

de la tabla 3 y de la tabla 6. Los resultados obtenidos en este experimento muestran que todas las bacterias analizadas conservan sus fenotipos Rec A y Nus determinados originalmente en las mutantes.

(E) Analisis del efecto de la rifampicina sobre el crecimiento de las mutantes aisladas.

Otro paso en la caracterizacion de las mutantes aisladas fue la determinacion de su resistencia a rifampicina. Los candidatos mutantes se sometieron a la accion de este antibiotico con la idea de saber si alguna de las bacterias aisladas presentaba una RNA-polimerasa alterada. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la tabla 12 en donde se utilizaron tres concentraciones diferentes de rifampicina (29). El candidato 8-1 es resistente a las tres concentraciones de rifampicina, sugiriendo esto que presenta una alteracion en la RNA-polimerasa, mientras que en el caso del candidato 7-6 se inhibe su crecimiento solamente a 100 ug/ml del antibiotico. Los demas candidatos se comportan como la bacteria progenitora, su crecimiento es sensible a este antibiotico. Con el trabajo experimental desarrollado hasta este punto, fue posible contar con un grupo de mutantes posiblemente alteradas en terminacion de la transcripcion asi como con una caracterizacion parcial de ellas. Entre la informacion obtenida, se puede mencionar que se localizaron las mutaciones en el genoma bacteriano, se determino el fenotipo Nus y Rec A mediante el desarrollo de bacteriofagos y la utilizacion de nitrofurantoina y se analizo la sensibilidad de las cepas mutantes a la rifampicina. Como siguiente paso, se

Candidato	* *			Igal8bio11	Genotipo
	lcI857 IN	IN	nut L		
3-1 ori	+	+	+	+	
3-1 cur	+	+	+	+	nus ⁺ rec A ⁺
3-1 tra	+	+	+	+	
7-6 ori	+	+	-	-	
7-6 cur	+	+	-	-	nus ⁺ rec A ⁻
7-6 tra	+	+	-	-	
8-1 ori	-	+	-	-	
8-1 cur	-	+	-	-	nus ⁻ rec A ⁻
8-1 tra	-	+	-	-	
7-1 ori	-	+	-	-	
7-1 cur	-	+	-	-	nus ⁻ rec A ⁻
7-1 tra	-	+	-	-	
SA1943	+	+	+	+	
730 nus A ⁻	-	+	+	-	
D600	+	+	+	+	
SA1943 rec A ⁻ pKG1800tI	+	+	-	-	

Tabla 11 . CRECIMIENTO DE BACTERIOFAGOS LAMBDOIDES EN LOS CANDIDATOS MUTANTES. La determinación de crecimiento se realizó por goteo de los bacteriofagos sobre un tapiz de bacterias, la prueba se incubó a 44°C. + significa crecimiento del fago, - ausencia de crecimiento de este. ori: mutante original, cur: mutante curado y tra: mutante transformado.

Candidatos	Concentracion de rifampicina		
	30 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
3-1	"+"	"+"	"+"
7-1	-	-	-
7-6	+	+	-
8-1	+	+	+
2-1	-	-	-
SA1943 pKG1800tI	"+"	"+"	"+"

Tabla 12 . SENSIBILIDAD DE LAS MUTANTES det A LA RIFAMPICINA.

Las bacterias fueron crecidas en 3 concentraciones diferentes del antibiotico (30 ug/ml, 50 ug/ml y 100 ug/ml).

+ = crecimiento bacteriano

"+" = inhibicion del crecimiento

- = ausencia de crecimiento.

planteo la localización de alguna de las mutantes en el genoma bacteriano.

IV. Localización genética de las mutaciones det.

Como se menciono previamente, el siguiente objetivo consistio en localizar la posición de las mutaciones obtenidas dentro del genoma bacteriano. Para lograr este objetivo se utilizo la transducción de material genético de las cepas 7-1, 3-1, 8-1, 2-1 y 7-6 utilizando el bacteriofago P1.

(A) Construcción de cepas poliauxotrofas gal K⁻ (pKG1800tI).

Se construyeron cepas poliauxotrofas gal K⁻ que contuvieran el plasmido pKG1800tI con el objeto de llevar a cabo la localización de las mutantes det aisladas.

La construcción de las cepas de interés se inicio con las bacterias AB1157 F⁻ str^R pro⁻ his⁻ arg⁻ leu⁻ lac⁻ gal⁻ xil⁻ mtl⁻ thi⁻ T6 1^{R s}, CA8000 Hfr H str^s thi⁻ y 603 Hfr C str^s thi⁻. (Las dos ultimas cepas fueron construidas para utilizarlas en experimentos de conjugación no realizados en este trabajo). El primer paso consistio en la determinación de algunas de las características genéticas de estas cepas. Se analizo el crecimiento de las mutantes y de la cepa AB1157 en medio mínimo con el fin de comprobar las auxotrofias de estas. Los resultados obtenidos permitieron concluir que tanto el grupo de las cepas mutantes con el cual se ha trabajado como la cepa AB1157 son auxotrofas para los aminoácidos de la tabla 16. En la tabla 13 se observan los resultados obtenidos en relación a la sensibilidad de las cepas analizadas al antibiótico estreptomycinina.

estreptomicina ug/ml	Cepas		
	AB1157	CA8000	603
25	+	-	-
50	+	-	-
75	+	-	-
100	+	-	-

Tabla 13. SENSIBILIDAD AL ANTIBIOTICO ESTREPTOMICINA. La sensibilidad de las cepas AB1157, CA8000 y 603 a estreptomicina se determino utilizando varias concentraciones de este antibiotico. + crecimiento, - ausencia de crecimiento.

Para determinar si la cepa AB1157 presentaba el genotipo gal K^- , condicion necesaria para detectar la no terminacion de la transcripcion en el plasmido pKG1800tI ---en el caso de transducir las mutaciones det a esta bacteria--- se procedio a transformarla con el plasmido pKG1800. Las celulas transformantes que resultaron presentaron una coloracion roja en medio medio Mac Conkey-galactosa, esto indico que efectivamente la cepa AB1157 presentaba el genotipo gal K^- y que la expresion del gene gal K del plasmido pKG1800 dio como resultado la utilizacion de la galactosa, los resultados de este experimento se presentan en la tabla 14.

Debido a que se obtuvieron colonias rojas con el plasmido pKG1800, se puede concluir que la cepa AB1157 es gal K^- . Asi mismo, en estas cepas tambien se determino que la terminacion de la transcripcion fuera deficiente para el plasmido pKG1800tI.

En relacion a las cepas Hfr, CA8000 y 603, que seran utilizadas posteriormente, fue necesario transducirles el gene gal K^- . Esto se logro por medio de la transduccion con el bacteriofago P1 y se seleccionaron las cepas transductantes en medio de cultivo Luria con el antibiotico tetraciclina, ya que este fago lleva un transposon que confiere resistencia a este antibiotico cerca del gene gal K. A estas colonias se les probó su coloracion en medio Mac Conkey-galactosa despues de crecerlas a 42°C durante 18 hrs con el objeto de seleccionar aquellas transductantes para gal K (colonias blancas). Los resultados de esta transduccion se presentan en la tabla 15.

Cepas	Plasmido	Fenotipo Gal
AB1157	-	B
AB1157	pKG1800	R
AB1157	pKG1800tI	B

Tabla 14 . TRANSFORMACION DE LA CEPA AB1157 CON LOS PLASMIDOS pKG1800 Y pKG1800tI. Determinacion del genotipo gal K en las cepas AB1157, AB1157 pKG1800 y AB1157 pKG1800tI. La determinacion del fenotipo gal se realizo como en los experimentos anteriores; en medio Mac Conkey-galactosa con o sin ampicilina de acuerdo a la cepa que se probó. La temperatura de incubacion fue de 42°C.

Cepas	Frecuencia de Transduccion
603	0.60
CA8000	0.75

Tabla 15 . TRANSDUCCION DE LA MUTACION gal K A LAS CEPAS CA8000 Y 603. El gene gal K transducido a las cepas CA8000 y 603 proviene de la cepa SA1943 gal K⁻. Las celulas transductantes se seleccionaron en medio de cultivo Luria con tetraciclina (12.5 ug/ml). Estas colonias se crecieron en medio Mac Conkey-galactosa a 42°C durante 18 hrs y se determino la frecuencia de transduccion, dividiendo el numero de colonias blancas (gal K⁻) entre el numero de colonias totales.

Después de haber construido las cepas 603 gal K⁻ y CA8000 gal K⁻, se llevo a cabo su transformación con el plasmido pKG1800tI. Estos resultados se presentan en la tabla 16. Como puede verse en los resultados de la tabla 16, en las cepas construidas funciona eficientemente el terminador de la transcripción tI, observandose colonias blancas en el medio Mac Conkey-galactosa. Sin embargo, se presenta un fondo de colonias rojas, esto puede deberse a que estas cepas son rec A⁺ presentandose el mismo fenomeno ya descrito para la cepa SA1943. El fenotipo de la cepa 603 gal K⁻ transformado con el plasmido pKG1800tI fue singular ya que se obtuvieron colonias blancas con un centro pequeño de color rojo. Para poder efectuar los experimentos de mapeo genetico utilizando estas cepas, es necesario eliminar la producción de coloración roja que se obtiene de fondo.

(E) Transducción de las mutaciones det.

La cepa poliauxotrofa AB1157 fue transducida con el DNA proveniente de las mutantes y se analizo la reversion de alguno de los marcadores para requerimientos nutricionales de esta cepa asi como el fenotipo de terminacion de la transcripcion deficiente. El bacteriofago P1 lleva a cabo transduccion generalizada movilizando hasta dos minutos del genoma bacteriano aledaños al marcador genetico seleccionable (29). Esta estrategia nos permitiria saber si alguna de las mutaciones det se localiza alrededor de dos minutos del marcador seleccionado.

El primer paso fue obtener los lisados de los candidatos

Cepas	Coloracion en medio MacConkey-galactosa	
	Blanco	Rojo
603 gal K ⁻	96%	4%
CA8000 gal K ⁻	95%	5%

Tabla 16 . TRANSFORMACION DE LAS CEPAS 603 gal K⁻ y CA8000 gal K⁻ CON EL PLASMIDO pKG1800tI. En esta tabla se muestran los porcentajes de colonias rojas y blancas respectivamente, obtenidas despues de la transformacion con el plasmido pKG1800tI.

mutantes utilizando el bacteriofago P1. Este lisado se obtuvo por la induccion de las lisogenas previamente construidas con el metodo descrito en la seccion de material y metodos. Cabe señalar que se obtuvieron dos tipos de lisados: (a) lisados de las mutantes conteniendo el plasmido pKG1800tI y (b) lisados de las mutantes curadas del plasmido pKG1800tI.

Los lisados que se utilizaron en los siguientes experimentos fueron los obtenidos a partir de los candidatos curados, es decir, los lisados del tipo (b) ya que los lisados obtenidos a partir de las cepas que contengan el plasmido podian interferir en la seleccion de transductantes det debido al riesgo de que se transdujera el gene gal K en lugar de la mutacion de interes. Los titulos de los lisados obtenidos utilizando P1 fueron los siguientes: del candidato 2-1 7×10^{10} , del 3-1 7×10^{10} , del 8-1 4×10^{10} , del 7-6 2×10^8 y del 7-1 1×10^9 . El siguiente paso fue transducir a la cepa poliauxotrofa AB1157 pKG1800tI las mutaciones det. La seleccion de las bacterias transductantes se llevo a cabo en medio minimo suplementado con lo siguiente: casaminoacidos, el antibiotico ampicilina (50 ug/ml) y como fuente de carbono galactosa. De este modo, se seleccionarian las bacterias capaces de metabolizar galactosa, es decir, aquellas que presentaran la mutacion det que permitiera la expresion del gene gal K contenido en el plasmido. Las transductantes AB1157 pKG1800tI obtenidas se probaron en medio Mac Conkey-galactosa con ampicilina a 42°C y todas las colonias presentaron coloracion roja, resultado esperado por el metodo de seleccion que se empleo. En la tabla 17 se presentan los resultados que se

obtuvieron al probar estas colonias transducentes AB1157
pKG1800tI con respecto a las auxotrofias de la cepa original,
con el objeto de tratar de localizar las mutaciones obtenidas.

De los resultados de la transduccion de las mutaciones det
anteriormente mencionada y de la tabla 17 se puede concluir que
solamente en uno de los casos se presento cotransduccion entre la
mutacion det y uno de los marcadores de auxotrofia de la cepa
AB1157, la transduccion en donde se utilizo DNA del candidato
mutante 7-6. El marcador genetico treonina thr⁺ cotransdujo con
la mutacion det del candidato 7-6 nus⁺ rec A⁻ y permitio el
crecimiento de la cepa AB1157.

Medio Selectivo	Origen de los Lisados:				
	3-1	2-1	7-1	7-6	8-1
800	+	+	+	+	+
801 sin thr	-	-	-	+	-
802 sin pro	-	-	-	-	-
803 sin his	-	-	-	-	-
804 sin arg	-	-	-	-	-
805 sin leu	-	-	-	-	-
806 sin thi	-	-	-	-	-

Tabla 17 . TRANSDUCCION DE LA CEPA AB1157 pKG1800tI CON LAS DISTINTAS MUTACIONES det. La cepa AB1157 pKG1800tI fue transducida con las mutaciones det de los candidatos 3-1, 2-1, 7-1, 7-6 y 8-1. Las bacterias transducentes se inocularon en medios de cultivo selectivos con los requerimientos nutricionales de la cepa AB1157 excepto el indicado en cada caso. El medio de cultivo 800 tiene todos los requerimientos nutricionales de la cepa AB1157. + indica crecimiento y - indica ausencia de crecimiento bacteriano.

DISCUSION.

En este trabajo se utilizó el terminador transcripcional tI, con el objeto de identificar factores bacterianos que participan en la terminación transcripcional. El terminador tI se localiza en el genoma del bacteriofago lambda en la región denominada sib y permite terminar el mensaje que proviene del promotor P_I, expresándose así el gene int del bacteriofago lambda (26). Este terminador es independiente de la proteína Rho (27). En el plasmido utilizado pKG1800tI, este terminador está precediendo al gene gal K, de tal manera que al haber terminación transcripcional no se expresa este gene, obteniéndose colonias blancas en el medio indicador.

Aislamiento de mutantes det y su caracterización.

El sistema utilizado para aislar mutantes deficientes en terminación transcripcional, formado por el plasmido pKG1800tI, la cepa SA1943 gal K⁻ y el medio de cultivo indicador Mac Conkey -galactosa, fue adecuado debido a que permite determinar de una manera sencilla, mediante coloración de colonias (rojas o blancas), la ocurrencia o ausencia de terminación transcripcional en un terminador o en un grupo de terminadores dado. Este sistema también permite cuantificar el grado de terminación, mediante la cuantificación de unidades de Gal K (30).

El primer paso en este trabajo fue el establecimiento de las condiciones adecuadas para la obtención de terminación en el sitio tI (formación de colonias blancas), punto de partida indispensable para aislar las mutantes det (ver tabla 1).

+

Debido a que cepas rec A⁺ que contenian el plasmido pKG1800tI presentaban un fondo de colonias rojas probablemente generadas por recombinacion entre el DNA del plasmido y el genoma bacteriano, se partio de una cepa rec A⁻ y despues de la mutagenesis se buscaron los candidatos con fenotipo deficiente en terminacion. Los ensayos se realizaron a 42°C, debido a que a esta temperatura se observaba mejor definida la coloracion.

Las mutantes aisladas despues de mutagenizar con nitrosoguanidina, que presentaron coloracion roja en medio Mac Donkey-galactosa se caracterizaron por el criterio de crecimiento de bacteriofagos lambdoides que definen fenotipos Nus y Rec A. El marcador nus se analizo ya que se ha descrito que estos loci estan involucrados en la terminacion de la transcripcion (15). Algunas mutantes se comportaron como nus⁻ ya que inhibieron el crecimiento del bacteriofago cI857 y permitieron el crecimiento de fagos IN^{*} y lnin5 (ver la tabla 3). En la caracterizacion del marcador nus se utilizo la cepa control nus A⁻ sin embargo, otras mutaciones nus producen el mismo fenotipo que esta mutacion cuando son caracterizadas con los fagos lambdoides ya descritos. Por este mecanismo no es posible definir de que mutacion nus se trata, o bien, si este fenotipo lo produce una mutacion distinta a las nus⁻ ya descritas. Partiendo de la caracterizacion hecha con los fagos lambdoides se encontro el siguiente comportamiento para los candidatos det: mutantes originales, candidatos curados (sin plasmido pKG1800tI) y candidatos mutantes transformados con plasmido pKG1800tI, con respecto al marcador genetico nus: 7-6
 +
 nus rec A⁻, 8-1-nus⁻ rec A⁻, 3-1 nus rec A⁺, 2-1 nus rec A⁺ y 7-1

nus⁻ rec A⁻ (ver tablas 3,6,9 y 11).

De la información aquí recabada resultan particularmente interesantes los candidatos 7-6, 3-1 y 2-1 los cuales se comportan como nus⁺, ya que en estos casos las bacterias presentan alguna mutación distinta de los loci nus que determina el fenotipo de deficiencia en terminación. También resultan interesantes los candidatos 8-1 y 7-1 los cuales se comportan como nus⁻. Una caracterización ulterior nos diría si se trata de mutaciones nus ya descritas (31), o bien distintas.

Por otro lado, se demostró que las mutaciones det se encontraban en el genoma bacteriano descartando la posibilidad de que se localizaran en el plásmido o que fuera un efecto que involucrara tanto al genoma bacteriano como al plásmido. Los candidatos 3-1, 7-6, 8-1 y 7-1 obtenidos por previa mutagénesis de la cepa SA1943 (pKG1800t1) fueron tratados para eliminar el plásmido y posteriormente se transformaron con el plásmido silvestre (sin mutagenizar), observándose que conservaban el fenotipo mutante (ver tablas 5 y 6).

Cabe señalar que la curación del plásmido pKG1800t1 tanto en las cepas mutantes como en las silvestres no fue sencilla, contrariamente a lo que suele ocurrir con otros plásmidos los que en algunos casos pueden perderse hasta espontáneamente si no se someten a presión selectiva (por ejemplo, por no agregar el antibiótico selectivo). Durante el desarrollo de este trabajo, no se intentó determinar la causa de esta "resistencia" a la curación del plásmido en cuestión (ver tabla 7).

De los dos protocolos utilizados para la obtención de

mutantes, el mayor número de candidatos mutantes se obtuvo cuando la cepa SA1943 rec A⁻ utilizada, llevaba el plasmido pKG1800tI, esto se pudo deber, a que el plasmido ejerció una presión selectiva para el aislamiento de este tipo de mutantes.

En relación al marcador rec A, se encontró que los candidatos mutantes 3-1 y 2-1 presentan un genotipo rec A⁺ mientras que los candidatos 7-1, 7-6 y 8-1 se comportaron como rec A⁻. Este resultado se observó tanto al utilizar fagos lambdoides como al utilizar el compuesto nitrofurantoina. Se sometieron a la acción de la nitrofurantoina tanto las cepas mutantes originales, los candidatos curados (sin plasmido pKG1800tI) como los candidatos transformados con el plasmido silvestre (tabla 10).

Con respecto a los candidatos 3-1 y 2-1 que se comportan como rec A⁺ sería posible transducirles la mutación rec A⁻ de manera que se demuestre si el fenotipo Rec A se debe realmente a una modificación del gene rec A. Esto puede lograrse utilizando cepas donadoras que lleven un transposon que confiera resistencia a algún antibiótico y que se encuentre junto al gene rec A.

Se ha descrito que el antibiótico rifampicina se une a la RNA polimerasa modificando su actividad (32), mutantes resistentes a la acción de este antibiótico muestran estar alteradas en la subunidad beta (33) o en el complejo beta-alfa² de la RNA polimerasa (34). Se analizó el comportamiento de las mutantes det en presencia de rifampicina con el objeto de obtener información acerca de la funcionalidad de la RNA polimerasa. Sin embargo, el experimento aquí descrito fue preliminar, ya que

seria adecuado realizar un experimento mas fino que consistiria en la determinacion de la cinetica de inhibicion causada por el antibiotico. Sin embargo, se pudo observar que el candidato 8-1 es resistente al antibiotico, sugiriendo que puede mostrar una alteracion en la RNA polimerasa. La caracterizacion de una mutante de este tipo permitira saber el papel que juega la RNA polimerasa en la terminacion de la transcripcion.

En relacion a la localizacion genetica de las mutaciones det, una primera aproximacion consistio en cotransducir las mutaciones de interes en algunos de los marcadores geneticos que pudieran identificarse en la cepa poliauxotrofa AB1157 PKG1800tI. Los marcadores geneticos utilizados se encuentran distribuidos uniformemente a lo largo del genoma bacteriano, sin embargo; la posible localizacion de la mutacion det estaba supeditada a la proximidad de dos minutos con los marcadores geneticos.

Los resultados mostraron que para el candidato 7-6 la mutacion det cotransducia con el marcador thr (biosintesis de treonina), lo cual nos indica que la mutacion se localiza en los dos minutos aledaños al gene thr. La cotransduccion de la mutacion se detecto por la selectividad del medio de cultivo utilizado y por la coloracion en medio Mac Conkey-galactosa (ver tabla 17). La cepa AB1157 es thr⁻, y no obstante que su fenotipo puede estar dado por mutaciones que afecten a los tRNA thr, lo mas probable es que la cepa AB1157 este mutada en el operon de biosintesis de treonina el cual se localiza en el minuto cero del genoma de E. coli (35). Esta dificultad puede ser

superada por medio de transducciones con el bacteriofago P1. ¿ Y que hay cerca de thr (min 0) que pueda ser cotransducido por el bacteriofago P1 ? de los genes que se han descrito que se encuentran cercanos al gene thr (min 0) resulta interesante el gene sfr A ya que se ha encontrado que codifica para un factor de regulacion de la transcripcion, aunque no ha sido totalmente aclarado su mecanismo de accion (23). Los resultados de la tabla 17 tambien mostraron que para los candidatos mutantes 3-1, 2-1, 7-1 y 8-1 no se encontro la cotransduccion de las mutaciones det con los marcadores nutricionales de la cepa AB1157 pKG1800 tI.

Otra alternativa para la localizacion genetica de las mutaciones det, es el uso de un banco de genes de E. coli silvestre, cuyo vehiculo es el fago lambda, de esta manera se pueden utilizar estos fagos para analizar la reversion de mutaciones aledañas a la mutacion que se pretende mapear y cuyas posiciones sean conocidas, detectando al mismo tiempo la reversion de la mutacion det. Por otra parte, tambien es util el banco de genes de E. coli silvestre porque se podria obtener el fragmento de DNA que codifica para el producto cuyo efecto se estudia y asi poder clonarlo en vehiculos apropiados para expresarlo. De esta forma, se podrian realizar diversos experimentos entre los que se incluye la caracterizacion bioquimica y experimentos de transcripcion in vitro de los factores identificados.

En otra linea de experimentos y continuando con la caracterizacion de estas mutantes se podria analizar el efecto de las mutantes aisladas en permitir el funcionamiento de

diversos terminadores transcripcionales, es decir, tanto dependientes como independientes de Rho. Por ejemplo tL2, tL3, etc., ya sea en el sistema multicopia de pKG1800, o en sistemas de copia unica como las fusiones de bacteriofagos lambdoides que llevan los genes gal K o lac Z a las cuales preceden terminadores de la transcripcion. Se podria analizar la expresion de tales genes de manera sencilla y observar el efecto de las mutaciones det en estos sistemas.

Otro punto interesante seria el analisis del desarrollo del fago lambda N⁻ (la proteina N es necesaria para la antiterminacion y por ende para el desarrollo del fago) determinando su cinetica de crecimiento sobre las mutantes con el fin de saber si las mutaciones estudiadas intervienen con la funcion de N.

Dentro de la caracterizacion de las mutantes det seria interesante secuenciar las mutaciones para conocer la alteracion provocada por ellas.

En todos los experimentos mencionados se trataria de averiguar la especificidad de los genes identificados sobre distintos terminadores y determinar si se trata de un mecanismo general o particular de terminacion de transcripcion. Finalmente se contaria con informacion sobre el papel que tienen estos factores en la regulacion de la expresion genica.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Adhya, S., and Gottesman, M. (1978). Control of transcription termination. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 967.
- 2.- Rosenberg, M., and Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13: 319.
- 3.- Adhya, S., Gottesman, M., and De Crombrughe, B. Termination and Antitermination in Transcription: Control of Gene Expression. Reimpresion de: Control of Transcription. Editado por B.B. Biswas, R.K. Mandal, A. Stevens y W.E. Cohn. pp. 213 Laboratory of Molecular Biology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.
- 4.- Platt, T. (1981). Termination of Transcription and its Regulation in the Tryptophan Operon of *E. coli*. *Cell* 24: 10.
- 5.- Roberts, J.W. (1969). Termination Factor for RNA synthesis. *Nature* 224: 1168.
- 6.- Wulff, D.L. (1976). Lambda cin-1, a new mutation which enhances lysogenization by bacteriophage lambda, and the genetic structure of the lambda *cy* region. *Genetics* 82: 401.
- 7.- De Crombrughe, B., Adhya, S., Gottesman, M., and Pastan, I. (1973). Effect of Rho on transcription of bacterial operons. *Nature New Biol.* 241: 260.
- 8.- Rosenberg, M., Court, D., Shimatake, H., Brady, C., and Wulff D.L. (1978). The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in Phage lambda. *Nature* 272: 414.
- 9.- Howard, B., and De Crombrughe, B. (1975). ATPase activity

- required for termination of transcription by the *E. coli* protein factor rho. *J. Biol. Chem.* 251: 2520.
- 10.- Galluppi, G., Lowery, C., and Richardson, J.P. (1976). Nucleoside triphosphate requirement for termination of RNA synthesis by rho factor, *en: RNA polymerase*. Editado por R. Losik y M. Chamberlin. pp. 657. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- 11.- Minkley, E.C. Jr. (1973). Functional Form of RNA Synthesis Termination Factor Rho. *J. Mol. Biol.* 78: 577.
- 12.- Oda, T., Takanami, M. *en: Adhya, S., and Gottesman, M.* (1978). Control of transcription termination. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 967.
- 13.- Georgopoulos, C.P. (1971). Bacterial mutants in which the gene N function of bacteriophage lambda is blocked have altered RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68: 2977.
- 14.- Friedman, D.I. (1971). A bacterial mutant affecting lambda development. *En: The Bacteriophage lambda*. Editado por A.D. Hersey. pp. 733. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- 15.- Friedman, D.I., and Gottesman, M. (1983). Lytic Mode of Lambda. *En: Lambda II*. Editado por R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl y R.A. Weisberg, pp. 21. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- 16.- Greenblatt, J., McLimont, M., and Hanly, S. (1981). Termination of transcription by nus A gene protein of *E. coli* *Nature* 292: 215.
- 17.- Kington, R.E., and Chamberlain, M.J. (1981). Pausing and

attenuation of in vitro transcription in the *rrn B* operon of *E. coli*. *Cell* 27: 523.

- 18.- Farnham, P.J., Greenblatt, J., and Platt, T. (1982). Effects of Nus A protein on transcription termination in the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Cell* 29: 945.
- 19.- Greenblatt, J., and Li, J. (1981). Interaction of the sigma factor and the nus A gene protein of *E. coli* with RNA polymerase in the initiation-termination cycle of transcription. *Cell* 24: 421.
- 20.- Friedman, D.I., Schauer, A.T., Baumann, M.R., Baron, L.S., and Adhya, S.L. (1981). Evidence that ribosomal protein S10 participates in the control of transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1115.
- 21.- Platt, T. (1981). Termination of Transcription and Its Regulation in the Tryptophan Operon of *E. coli*. *Cell* 24: 10.
- 22.- Lacatena, R.M., Banner, D.W., Castagnoli, C., and Cesareni, G. (1984). Control of Initiation of pMB1 Replication: Purified Rop Protein and RNA 1 Affect Primer Formation in vitro. *Cell* 37: 1009.
- 23.- Beutin, L., Manning, P.A., Achtman, M., and Willetts, N. (1981). *sfr A* and *sfr B* Products of *Escherichia coli* K-12 are Transcriptional Control Factors. *J. of Bacteriology.* 145: 840
- 24.- Guidi-Rontani, Ch., Danchin, A., and Ullmann, A. (1984). Transcriptional Control of Polarity in *Escherichia coli* by cAMP. *Mol. Gen. Genet.* 195: 96.
- 25.- Aksoy, S., Squires, G.L., and Squires, C. (1984). Evidence for Antitermination in *Escherichia coli* rRNA Transcription.

- J. of Bacteriology, 159: 260.
- 26.- Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg, M., and Court, D. (1984). Transcription Terminator involved in the expression of the *int* gene of phage Lambda. *Gene* 28: 343.
- 27.- Luck, K.C., Dobrzanski, P., and Szybalski, W. (1982). Cloning and characterization of the termination site *tI* for the gene *int* transcript in phage lambda. *Gene* 17: 259.
- 28.- Miller, H.J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics* by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 29.- Alikhanian, S.I., Debabov, V.T., Tovmasion, C.N., Kopcickina S.T., Nickiforova, I.D., Severina, T.A. Piruzian, E.S., and Pogosov, J.Z. (1970). Temperatura dependent rifampicin resistant mutations of DNA-dependent RNA-polymerase of *Escherichia coli*. In: *RNA-Polymerase and Transcription*. Editado por L. Silvestri, pp. 28. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
- 30.- McKenney, K., Shimatake, H., Court, D., Schmeissner, U., Brady, C., and Rosenberg, M. (1981). A System Study Promoter and Terminator Signals Recognized by *Escherichia coli* RNA-Polymerase. In: *Gene Amplification and Analysis: Analysis of Nucleic Acids by Enzymatic Methods*, pp. 383. Elsevier/ North Holland New York.
- 31.- Greenblatt, J., Li, J., Adhya, S., Friedman, D.I., Baron, L. S., Redfield, B., Kung, H., and Weissbach, H. (1980). A Factor that is required for β -galactosidase synthesis is the *nus A* gene product involved in transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 1991.

- 32.- Sippel, A., and Hartmann, G. (1969). Mode of Action of rifamycin on the RNA polymerase reaction. *Biochem. Biophys. Acta* 157: 218.
- 33.- Rabussay, D., and Zilling, W. (1969). A rifampicin resistant RNA polymerase from *E. coli* altered in the B-subunit. *FEBS Letters* 5: 104.
- 34.- Stetter, K.O., and Zilling, W. (1974). Transcription in *Lactobacillaceae*. DNA-dependent RNA polymerase from *Lactobacillus curvatus*. *Eur. J. Biochem.* 48: 527.
- 35.- Bachmann, B.J. (1983). Linkage Map of *Escherichia coli* K-12. Edition 7. *Microbiological Reviews* 47: 180.
- 36.- Sussman, R., and Jacob, F. (1962). Sur un systeme de repression thermosensible chez le bacteriophage lambda d'*E. coli*. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 254: 1517.
- 37.- Court, D., and Sato, K. (1969). Studies of novel transducing variants of lambda: dispensability of genes N and O. *Virology* 39: 348.
- 38.- Feiss, M., Adhya, S., and Court, D. (1972). Isolation of a plaque forming, galactose transducing strain of phage lambda. *Genetics* 71: 189.
- 39.- Manly, K., Sanger, E.R., and Radding, C.M. (1969). Non essential functions of bacteriophage lambda. *Virology* 37: 177
- 40.- Vaca, S., and Guarneros, G. (1985). Isolation and Characterization of a lambda-bacteriophage mutant able to grow on an *Escherichia coli* nus A-1 host. *Rev. Latinoamericana de Microbiologia* 27(2): 151.