



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**ANALISIS MUTACIONAL DEL MINIGEN *barI*  
DEL BACTERIOFAGO Lambda.**

**PROYECTO DE INVESTIGACION  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
Q U I M I C O  
P R E S E N T A  
BENITO AGUILAR CARRILLO**

**ASESORES: DR. GABRIEL GUARNEROS PERA  
DRA. GILDA FLORES ROSALES**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1992**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN  
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 el  
Proyecto de Investigación " Análisis Mutacional del Minigen  
bari del Bacteriófago Lambda"

que presenta el pasante: Benito Aguilar Carrillo  
con número de cuenta: 8608534-0 para obtener el TITULO de:  
Químico

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 6 de Noviembre de 1996

PRESENTE	<u>Dra. Gilda Flores Rosales</u>
VOCAL	<u>Dr. Jorge Tortora Pérez</u>
SECRETARIO	<u>Dra. Susana Mendoza Elvira</u>
1er. SUPLENTE	<u>QFB Edgar Aguilera Cerón</u>
2do. SUPLENTE	<u>QFB Carolina Moreno Ramos</u>

*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*

**El autor agradece el apoyo incondicional y las enseñanzas de su tutor, El Dr. Gabriel Guarneros Peña, las discusiones alentadoras y la constante revisión de este escrito del M. C. Raymundo Fidel Mendez Canseco, la disponibilidad y apoyo de la Dra. Gilda Flores Rosales. A los tres, les agradece la lectura de este proyecto así como sus sugerencias.**

**Un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Centro de investigación y de Estudios Avanzados del IPN, por el apoyo económico al autor durante la realización de este proyecto.**

**Este trabajo será realizado en el laboratorio 3 del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del Dr. Gabriel Guarneros Peña.**

**Agredecimientos especiales**

a:

**Mi santa madre y mi papa (a quienes dedico este trabajo)  
mi hermano Teo  
F. Mendez  
mis demas hermanos y amigos**

## INDICE GENERAL

Indice general.....	i
Indice de figuras y tablas.....	ii
Resumen.....	1
1.0 Introducción.....	2
1.1 La interacción entre el bacteriófago $\lambda$ y <i>Escherichia coli</i> .....	3
1.2 La interacción <i>bar-pth</i> .....	4
1.3 La secuencia del RNA de <i>bar</i> es un minigen.....	8
1.4 El mecanismo de inhibición mediado por <i>bar</i> .....	14
1.5 Modelo de inhibición por los minigenes <i>bar</i> .....	14
1.6 Hipótesis de trabajo.....	17
2.0 Objetivos generales.....	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3.0 Materiales y métodos.....	19
3.1 Estrategía metodológica.....	25
4.0 Glosario.....	29
5.0 Bibliografía.....	31

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1a. Regiones <i>bart</i> y <i>bartI</i> del Bacteriófago lambda.....	7
Figura 1b. Secuencia nucleotídica de los minigenes <i>bart</i> y <i>bartI</i> .....	7
Figura 2a. Mutaciones puntuales que afectan el fenotipo del minigen <i>bart</i> .....	10
Figura 2b. RNA de <i>bar</i> , minigen <i>bart</i> y mutaciones que afectan el fenotipo Bar.....	11
Figura 3. Modelo de inhibición de la síntesis de proteínas mediado por el minigen <i>bart</i> .....	16
Figura 4. Diagrama general de la estrategia metodológica.....	20
Figura 5. Esquema lineal del vector pKQV4.....	22
Figura 6. Diseño de oligonucleótidos sintéticos.....	23
Figura 7. Clonación en el vector pKQV4.....	24
Tabla 1 Resumen de las mutaciones en el minigen <i>bart</i> .....	12
Tabla 2. Cepas de E. coli que se utilizarán en el desarrollo de este proyecto.....	21
Tabla 3. Mutaciones propuestas para evaluar las características del minigen <i>bart</i> .....	26

## RESUMEN

La peptidil-tRNA hidrolasa (Pth) es una enzima esencial en *E. coli* que hidroliza peptidil-tRNAs regenerando tRNA libres. Las mutantes parcialmente afectadas en la hidrolasa son incapaces de propagar al bacteriófago  $\lambda$ . Los fagos capaces de eludir esta exclusión presentan mutaciones llamadas *bar*. Los sitios definidos por las mutaciones contienen secuencias características de genes, pero con sólo tres codones. En vectores multicopia, la expresión de estos minigenes *bar* inhibe la síntesis de proteínas en células defectuosas en Pth. Los transcritos de los sitios *bar* presentaron propiedades inherentes a los RNAs mensajeros auténticos; se asocian a los ribosomas de manera específica e inducen la incorporación de metionina a la fracción ribosomal. Sin embargo, provocan la inhibición general de la síntesis de proteínas dependiente de la ausencia de Pth. Se propone que la inhibición mediada por *bar* se basa en el secuestro de un tRNA específico.



## **1.0 INTRODUCCION**

El estudio de los mecanismos que utilizan las bacterias para la exclusión de los bacteriófagos ha sido de mucha utilidad para comprender la genética de procariontes y eucariontes. Algunos de estos modelos de exclusión han sido estudiados desde los años 50's, sin embargo, sus bases moleculares son todavía poco claras. Dos modelos bacterianos de exclusión de fago como Lit y Prr (Snyder, 1995) tienen un mecanismo muy similar que involucra el control traduccional. Ambos emplean enzimas específicas para componentes celulares conservados evolutivamente, los cuales son activados por péptidos o determinantes protéicos codificados por el genoma del fago. Una vez activadas, estas enzimas inactivan a componentes del aparato traduccional. Es factible pensar que otros mecanismos de exclusión de fagos no definidos hasta hoy actúan de un modo similar, es decir, involucrarían señales originadas durante la traducción del genoma del fago, que interactuarían con enzimas o factores protéicos celulares causando un defecto en el sistema traduccional. Debido a su especificidad y a la naturaleza de sus blancos de acción, estos modelos de exclusión representan una fuente de enzimas que podrían tener aplicaciones terapéuticas. Estos hechos, que en apariencia sólo conciernen a los estudiosos de la bioquímica básica de los microorganismos, tienen impacto en biotecnología. En algunos casos para la producción en gran escala de proteínas recombinantes en *E. coli*, se ha modificado la secuencia de sus genes para reemplazar codones raros por codones de uso más frecuente en la bacteria y así incrementar el rendimiento de sus fermentadores. Otra alternativa ha consistido en usar bacterias con

vectores que portan al gen o genes que codifican para los tRNAs limitantes, supliendo así la deficiencia en la poza celular de tRNA.

### **1.1 LA INTERACCION ENTRE EL BACTERIOFAGO $\lambda$ Y *Escherichia coli***

El bacteriófago  $\lambda$  es un fago que infecta a la bacteria intestinal *Escherichia coli*. En su desarrollo,  $\lambda$  puede seguir dos vías, la lítica o la lisogénica (Herskowitz y Hagen, D., 1980). Durante la ruta lítica, el cromosoma de  $\lambda$  es replicado y empaquetado dentro de la envoltura viral, los fagos se liberan, conduciendo al huésped a la lisis y muerte celular. Esto da origen a una progenia de aproximadamente 100 partículas virales por célula infectada (Weisber *et al.*, 1977).

En la vía lisogénica, el DNA del fago se integra al cromosoma bacteriano y se replica como parte de él (Echols H., 1972). Para permitir esta opción, el DNA del fago inyectado dirige la síntesis de productos génicos que promueven la inserción del DNA del fago en el cromosoma de la célula huésped, y después expresa otros genes cuyos productos reprimen su replicación autónoma. Cuando estos procesos se llevan a cabo apropiadamente, el DNA del fago es insertado en el cromosoma de la bacteria en un sitio característico. Estudios de secuenciación han revelado que los sitios de la bacteria y el fago comparten una identidad de 15 pares de bases (pb) y que la unión y excisión del DNA toma lugar en esta región (Echols y Guarneros, 1983). El sitio de unión del fago es conocido como *attP*, mientras que el sitio de unión de la bacteria es definido como *attB*. A este evento se le denomina integración.

La integración requiere de la función del gene *int*, mientras que la excisión requiere tanto de *int* como de *xis*. Ambos genes están contenidos en el genoma de  $\lambda$ . La proteína Int es la enzima que cataliza la integración del DNA de lambda en el cromosoma del huésped. Al fago integrado en el genoma se le llama profago. Para que éste se mantenga en tal estado, es esencial la funcionalidad del represor CI, codificado por el gen *ci*. El represor previene la expresión de los genes de otros profagos y también sirve para mantener la lisogenia (Echols y Guarneros, 1983).

Los mecanismos de control replicativo y transcripcional de  $\lambda$  se conocen ampliamente. Sin embargo, poco se conoce acerca del control traduccional en el desarrollo del fago. El presente proyecto esta encaminado a esclarecer un aspecto relacionado con la regulación traduccional, el cual involucra la interacción de una secuencia del genoma de lambda, llamada *bar*, con elementos aun no totalmente identificados de la maquinaria traduccional de la célula huésped, pero que de alguna forma están directa o indirectamente relacionados con la enzima peptidil-tRNA hidrolasa (Pth).

## 1.2 LA INTERACCION *bar-pth*.

Un enfoque para el estudio de las interacciones entre el fago y las funciones biológicas de la bacteria durante el desarrollo del virus invasor, ha sido el aislamiento de mutantes bacterianas incapaces de permitir el crecimiento de fagos silvestres. La identificación de los sitios genéticos involucrados en la interacción huésped-parasito ha

sido lograda mediante el aislamiento de mutantes complementarias mutuas en ambos simbioses.

En 1976, Henderson y Weil reportaron el aislamiento de una mutante de *E. coli* que impedía la propagación de  $\lambda$ . Esta mutante se denominó *rap* (restriction of *attP* + phage) por su incapacidad de soportar el crecimiento de fagos con una región *attP* silvestre. Posteriormente, se definió que la mutación *rap* es deficiente en la actividad de la enzima peptidil-tRNA-hidrolasa (Pth)(García-Villegas y col. 1991). La Pth es esencial para la célula y ha sido encontrada en todos los organismos donde se le ha buscado excepto en *Methanococcus jannaschii* (De la Vega, F. M. y col.1996; Bult, C. J. et al., 1996). La Pth hidroliza peptidil-tRNAs para dar como productos péptidos y tRNAs libres (Cuzin y col. 1967). Se ha propuesto que los sustratos específicos de la enzima Pth son los peptidil-tRNAs que se caen de los ribosomas prematuramente, en un evento de terminación abortiva. Esta terminación abortiva podría originarse por la incorporación de un aminoácido erróneo en la cadena polipeptídica naciente. La inactivación de la hidrolasa tiene como resultado una acumulación de peptidil-tRNAs en la célula y el agotamiento de tRNAs disponibles para la traducción (Heurgué-Hamard, V. y col. 1996), lo cual bloquea la síntesis de proteínas (Atherly y Menninger, 1972). Se ha aislado una mutante termosensible localizada en el gen *pth*.  $\lambda$  es excluido también en esta mutante. Con la finalidad de conocer qué regiones del genoma de lambda estaban involucradas en la interacción con*rap*, se aislaron mutantes de  $\lambda$  que permitieron el crecimiento en la cepa *rap*. La localización de las mutaciones en el

genoma de  $\lambda$ , que se denominaron *bar* (por blanco de acción de *rap*), fueron ubicadas en tres lugares del genoma de lambda: *barI*, en la región 3' del gen que codifica para la integrasa, entre el sitio de integración *attP* y el terminador transcripcional  $t_1$ ; *barII*, hacia el extremo 5' del gen *cIII-ssb*; y *barIII*, que se encuentra muy cercano a la región de inmunidad del fago (Guzmán y Guarneros, 1989) (Fig 1). La secuenciación de las regiones *barI* y *barII* reveló una homología de 14 (pb). La secuencia incluye repetidos invertidos de 6 pb (*barIa*) y 5 pb (*barII*). Las tres mutaciones puntuales secuenciadas, que fueron llamadas *bar101*, *bar103*, y *bar205*, representan transiciones en una de estas posiciones. Estas tres mutaciones caen dentro de los invertidos repetidos (Guzmán y col. 1990) (Fig. 1).

La transcripción de estas secuencias es esencial para la exclusión. Se emplearon fagos mutantes en promotores localizados río arriba de los sitios *bar*. La ausencia de expresión eliminaba la exclusión. Ello condujo a la clonación de las regiones *barIa* y *barII* en plásmidos multicopia, bajo el control del promotor  $p_L$ , el cual es inducible por un incremento en la temperatura. La transcripción de las secuencias *barI* y *barII* inhibe el crecimiento de la cepa *rap* (Guzmán y col. 1990). La expresión de las secuencias *bar* mutantes no es tóxica.

En un intento para proponer un mecanismo por el cual los plásmidos *bar* matan a la células *rap* se analizaron los efectos de la transcripción de *bar* sobre la replicación, transcripción y traducción en la célula. Este análisis reveló que la expresión de muchas proteínas de la célula huésped es inhibida en la cepa *pth* tras la inducción de los plásmidos

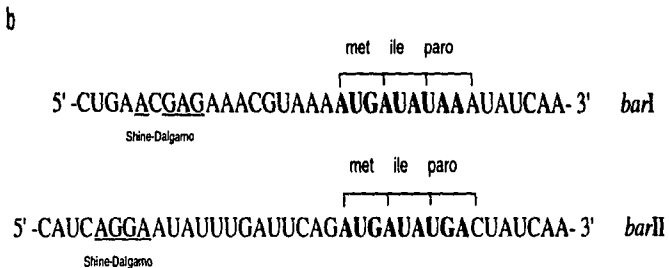
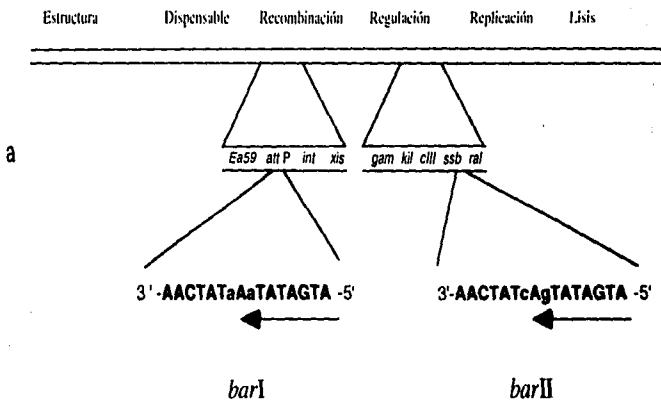


Figura 1. a) Regiones *barI* y *barII* del fago. b) Señales de traducción definidas en los minigenes *barI* y *barII*.

**bar** (Pérez-Morga y Guarneros, 1989; García-Villegas, M. R. 1988) .

Hubo un intento para definir la secuencia mínima requerida para la función Bar. La reconstrucción de la región *barI* con oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla, permitió situar a la región *bar* la entre los nucleótidos -24 y -44 en un fragmento de 21 pb (Rivera-Chavira, 1989).

Un análisis reciente de las secuencias *bar*, complementado con experimentos que se describirán más adelante, llevó a proponer que en el extremo 5' y 3' de la región *barI* existen señales importantes para el fenotipo de *bar*, que podrían ser alteradas mediante deleciones, inserciones e incluso mutaciones puntuales.

### **1.3 LA SECUENCIA DEL RNA DE *bar* ES UN MINIGEN**

El RNA de *barI* interactúa con la maquinaria traduccional. Experimentos de fraccionamiento celular demostraron que el RNA de *barI* se asocia con ribosomas 70S, en una manera similar a como se asocian los mRNAs (Hernández, J. *et al*, 1996). El análisis de las secuencias de *barI* y *barII* reveló la presencia de señales de inicio de la traducción: una secuencia tipo Shine-Dalgarno, una región espaciadora y un marco abierto de lectura mínimo. Este está constituido por un codón de inicio, un codón que especifica para isoleucina, seguido de un codón de paro (Figs. 2a y 2b). Curiosamente, el codón de isoleucina de este minigen (AUA) corresponde a una de las isospecies de tRNA con menor contenido relativo en *E. coli* (Inokuchi y Yamao, 1995). El pequeño marco

de lectura o gen mínimo detectado esta presente dentro del repetido invertido de las secuencias *bar* (Fig. 2a). Es probable que el RNA de *bar* fuese traducido. De hecho, se ha evaluado la capacidad de este RNA para formar complejos ternarios de iniciación de la traducción por la técnica de *toe-printing* (Hernández, J. y col., 1996). El que las señales traduccionales identificadas en *bar* tengan un papel en su función es apoyado por el hecho de que mutaciones en la región, aisladas en fagos capaces de abolir la exclusión en cepas *pth*, o en plásmidos que ya no ejercen un efecto letal en dichas células, presentan mutaciones en dichas señales traduccionales (Figura 2a y Tabla 1). (Guzmán y col. 1990; García-Villegas, 1988). Existen otras mutaciones localizadas fuera de la región *barI* que también afectan la función Bar. Estas mutaciones fueron aisladas en fagos deficientes en el proceso de retroregulación negativa (Guarneros *et al*, 1982). Dichas mutaciones, denominadas *sib*, afectan la funcionalidad del terminador  $\Omega$ , así como la estabilidad del RNA de *barI* (Montañez *et al*, 1986; Velázquez, 1992). Se ha establecido una relación directa entre la estabilidad del RNA de *barI* y su efecto tóxico, lo que ha apoyado la idea de que es el RNA de *barI* *per se*, y no su transcripción, quien posee la capacidad inhibitoria (Méndez-Canseco, 1994). Otras mutaciones localizadas en la región *barI* también tienen efectos negativos sobre la estabilidad del RNA. Es probable que dichas mutaciones afecten la capacidad de interacción del RNA con la maquinaria traduccional, y que por lo tanto, sean más susceptibles a degradación. Se ha demostrado que el RNA de *bar* es más estable en



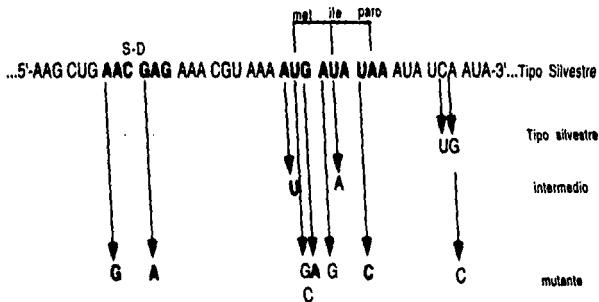


Figura 2a. Secuencia nucleotídica del RNA de *bat* que muestra las mutaciones puntuales obtenidas *in vivo* (negritas) y por mutagenesis dirigida (normal) que afectan la integridad del minigen.

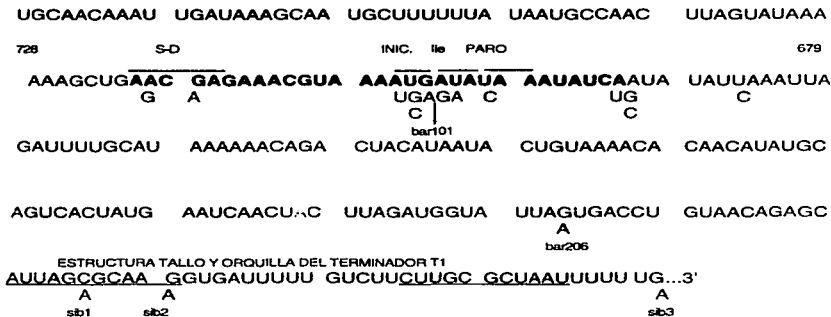


Figura 2b. Muestra un fragmento del RNA de *barI* en el cual se indica en negritas la posición del minigen *barI* y las señales de traducción que lo definen. También se presentan las mutaciones obtenidas *in vivo* y por mutagenesis dirigida que afectan la toxicidad del transcrito *barI*.

Tabla 1. Resumen de las mutantes y su efecto a 38°C y 42°C en células *pth(rap)*.  
 + indica letalidad celular, - indica viabilidad.

Alelo Bar	Origen	Efecto léxico 38 - 42°C	Estabilidad RNA (min)	Mutaciones del Efecto observado	Referencias
n1		+ -	4.6		Valedez, G. com. pers.
barG720	plasmido	- -	nd	Alelo S-O	Murguía, E. com. Pers.
barH718	lapo	- -	2.6	Alelo S-O	García-Villgas, M.R. 1988
barU706	lapo e in vitro	- +	3.9	Alelo codón inicio	Murguía, E. y Valedez, G. com. pers.
barG705	mutag in vitro	- -	1.7	Alelo codón inicio	Valedez, G. com. pers.
barC705	in vitro	- -	2.1	Alelo codón inicio	Valedez, G. com. pers.
barG702, A704	in vitro	- -	1.0	Alelo codón de inicio e le por Val	Valedez, G. com. pers.
barH704 (bar101)	lapo e in vitro	- -	0.9	Transforma a un codón de inicio de uso poco frecuente	Guzmán, P. and G. Guzmara 1988
barG703	in vitro	- -	nd	le por Val	Valedez, G. com. pers.
bar1702	in vitro	+ -	4.8	le por Lys	Valedez, G. com. pers.
barC700	lapo	- -	nd	Efecto sobre el codón de terminación	Guzmán, P. and G. Guzmara 1988
barG693	in vitro	nd	nd	Efecto en el consenso 3' que alteran un posible Downstream box.	Valedez, G. com. pers.
barC692	in vitro	- -	nd	Efecto en el consenso 3' que alteran un posible Downstream box.	Valedez, G. com. pers.
barG692	in vitro	nd	nd	Efecto en el consenso 3' que alteran un posible Downstream box.	Valedez, G. com. pers.
barA206	lapo	- +	2.4	Modifica la interacción y la estabilidad	Méndez-Caraco, 1994
sd1	lapo	- +	0.5	Efecto sobre la estabilidad del RNA	Méndez-Caraco, 1994
sd2	lapo	- +	2.7	Efecto sobre la estabilidad del RNA	Méndez-Caraco, 1994
sd3	lapo	- +	5.6	Efecto sobre la estabilidad del RNA	Méndez-Caraco, 1994

células *pth* que en las tipo silvestre (Pérez-Morga y Guarneros, 1991; Méndez-Canseco, 1994). Esto sugiere que el efecto protector de la maquinaria traduccional sobre el RNA de *bar* se favorece en condiciones donde proteínas Pth defectuosas son incapaces de aliviar la interacción. Más adelante se discutirá sobre este hecho.

¿Qué elementos secuenciales de *barI* son esenciales para el efecto tóxico? Se han obtenido una serie de mutaciones dirigidas que involucran cambios puntuales en la secuencia del minigen, así como en el contexto 3' del codón de paro. Se ha propuesto que las mutaciones *bar* U693, G692, C692 y C685 (Figura 2b y Tabla 1) están relacionadas con un efecto negativo sobre la interacción del rRNA 16S con un posible activador traduccional, *downstream box*, presente en el minigen. El fenotipo *bar* que han mostrado estas mutaciones han permitido generar hipótesis sobre la composición nucleotídica de la secuencia del minigen que correlacionan con su toxicidad (Tabla 1). Una de estas mutaciones (*barA702*) cambió al codón de isoleucina (AUA) por el codón AAA, que corresponde a lisina, y que es reconocido por un isoaceptor muy abundante en *E. coli*. Esta mutación presenta un fenotipo tóxico intermedio (Tabla 1), que puede revertirse *in vivo* e *in vitro*, con la suplementación del isoaceptor. La suplementación con el tRNA de isoleucina especificado por *barI* silvestre, también revierte la traducción, pero tiene un efecto parcial *in vivo* (Hernández, J. *et al*, 1996; Méndez-Canseco y Guarneros, 1996).

#### 1.4 EL MECANISMO DE INHIBICION MEDIADO POR *bar*.

¿Es el RNA de *bar* traducido? Existe evidencia obtenida por experimentos en un sistema acoplado de transcripción-traducción (TT) *in vitro* que ha aportado información valiosa en este respecto. Se ha mimetizado *in vitro* la inhibición de la síntesis de una proteína reportera,  $\beta$ -lactamasa (Bla). Este efecto es revertido por la adición de una preparación de Pth silvestre purificada y, en menor grado, por la adición de un lavado ribosomal silvestre, el cual contiene factores de inicio, elongación y terminación, además de tRNAs. Se ha tratado de evaluar la traducción del minigen de *bar1* a partir de la incorporación de [ $^{35}$ S]-metionina. Un análisis de fracciones en gradiente de sacarosa reveló la presencia de productos no identificados que contenían al radioactivo en las fracciones solubles y correspondientes a ribosomas 70S. Dichos productos, por la naturaleza del ensayo, podrían ser formil-metionil-isoleucil-tRNA o formil-metionil-tRNA. La concentración relativa de dichos productos disminuye si la mezcla de reacción es incubada con Pth silvestre (Hernández, J. *et al*, 1996).

#### 1.5 MODELO DE INHIBICION POR LOS MINIGENES *bar*.

El modelo propuesto para explicar la inhibición de la síntesis de proteínas por la traducción del minigen *bar* implica el agotamiento de los tRNAs especificados por *bar* y la intoxicación de los eventos traduccionales por peptidil-tRNAs generados por *bar*. Esto es: el RNA de *bar* es reconocido por los componentes traduccionales, que se avocarían a traducir el minigen. Por un mecanismo no claro aún, la terminación no ocurre y el dipeptidil-tRNA generado se *cae* del ribosoma. En una célula

silvestre, dicho dipeptidil es hidrolizado por la Pth, liberando al tRNA. En las células *pth*, el dipeptidil-tRNA se acumula, secuestrando en su molécula a tRNA que ya no está disponible para nuevos eventos de traducción. El mismo dipeptidil-tRNA sería tóxico, al competir con tRNAs iniciadores en la formación de nuevos complejos de iniciación. Después de que el tRNA especificado por *bar* se agota, se formarían complejos traducionales atascados sobre el mRNA *bar*, los que secuestrarían al tRNA iniciador y protegerían al RNA de la degradación por RNAsas. En el caso de los mRNAs celulares, los ribosomas se detendrían en los codones *hambrientos*, es decir, aquellos en que el isoceptor no está disponible ya que fue titulado por el efecto de *bar*. En este caso, también los ribosomas detenidos protegerían a los mRNAs de la degradación (Fig. 3). El modelo es aplicable para los alelos *bar* silvestre y *barA702*.

Este modelo es apoyado por las evidencias descritas anteriormente, y soportado por la siguiente información: i) El mRNA de *pth* carece de codones AUA, y sin embargo, su traducción es inhibida por *bar* silvestre. Esto se explicaría por intoxicación de la traducción causada por la acumulación de los dipeptidil-tRNAs derivados de *bar*; ii) la expresión de *bar* induce un cambio en el patrón de degradación del mRNA de *bla in vivo*. Experimentos de *northern-blot* muestran intermediarios de degradación estables. La suplementación de tRNA<sup>leuAUA</sup> revierte el disturbio generado por *bar*; iii) el RNA de *bar* es más estable en células *pth*. La suplementación de tRNA<sup>leuAUA</sup> desestabiliza al RNA *bar* a niveles semejantes al detectado en células silvestres (Méndez-Canseco y Guarneros, 1996).

# Modelo de la inhibición de la traducción por los mRNAs *bar* del bacteriófago $\lambda$ .

I. Disponibilidad del tRNA<sup>le</sup>

II. Limitación del tRNA<sup>le</sup>

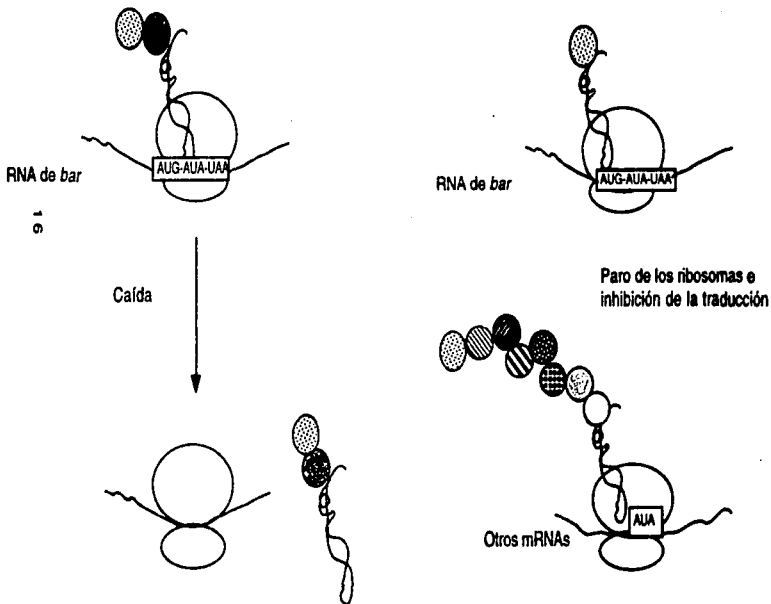


Figura 3. La inhibición de la traducción por el minigen *bar* de lambda.

## 1.6 HIPOTESIS DE TRABAJO

El modelo anterior nos lleva a plantear la siguiente interrogante:

¿Las características secuenciales del minigen de *barI* son indispensables para su efecto tóxico?

De alguna manera contribuyen: a) el tamaño del minigen, b) la naturaleza de los codones codificantes contenidos en el minigen, c) el tipo de codón de paro, e) la constitución de la secuencia Shine-Dalgarno y la región espaciadora en el efecto tóxico de *barI*.

¿Es posible la existencia de otros minigenes en el genoma de *lambda* que tengan un efecto similar a *barI* en cepas *pth*?



## **2.0 OBJETIVOS GENERALES**

1. Comprobar si el efecto tóxico del RNA de *bar* reside en las características secuenciales que lo definen como un minigen.
- 2.- Determinar si en el genoma del bacteriófago lambda existen otros minigenes con características similares a *bart* y *bartI*.

## **2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1a) Validar un sistema que permita la expresión regulada del minigen *bart* *in vivo*.
- 1b) Analizar el efecto de mutaciones en la secuencia de *bart*, que modifiquen la naturaleza del minigen *bar* en cuanto a su tamaño y contenido de codones, señales de traducción (secuencia Shine-Dalgarno, región espaciadora y codones de inicio y de paro), con la finalidad de analizar su impacto sobre la inhibición de la traducción en las células *pth*.
- 2) Clonación de segmentos del cromosoma de  $\lambda$  bajo un promotor inducible, para la búsqueda *in vivo* de secuencias que tengan un efecto análogo al de los minigenes *bar* en células *pth*.

### 3.0 MATERIALES Y METODOS

#### 1. Cepas y plásmidos

Las cepas de *E. coli* que serán utilizadas, su genotipo relevante y su procedencia se presenta en la Tabla 2. Las clonaciones se harán en el vector pKQV4 (Strauch, M.A. *et al.*, 1989), que se esquematiza en la Fig. 5.

#### 2. Procedimientos generales

La extracción de DNA plasmídico, transformación, electroforesis de DNA, reacciones de restricción y procedimientos de clonación serán realizados por métodos convencionales (Sambrook *y col.*, 1989). El cultivo celular se realizará utilizando medio Luria broth (LB), L-agar suplementados con Ampicilina (50 ug/ml)

#### 3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos que se sintetizarán estarán basados en la secuencia del RNA de *bar* que se presenta en la Figura 2. Se diseñarán oligos de cadena sencilla en dirección 5'-3' y su complementario, 3'-5', los cuales se hibridarán *in vitro*. Cada una de las cadenas sencillas llevarán en sus extremos las secuencias que complementen y regeneren los sitios de restricción *EcoR* I y *Hind* III (Figura 6). Los oligonucleótidos serán sintetizados en un sintetizador Applied Biosystems. El manejo de los oligonucleótidos se hará por técnicas convencionales (Sambrook *et al.*, 1989)

Una vez que los oligonucleótidos sean hibridados, se clonarán en los sitios *EcoR* I y *Hind* III del polilinker del vector pKQV4 (Fig. 7). La terminación de la transcripción a partir de *pTac* ocurre en los terminadores del operón *rrnB* (Fig. 5).

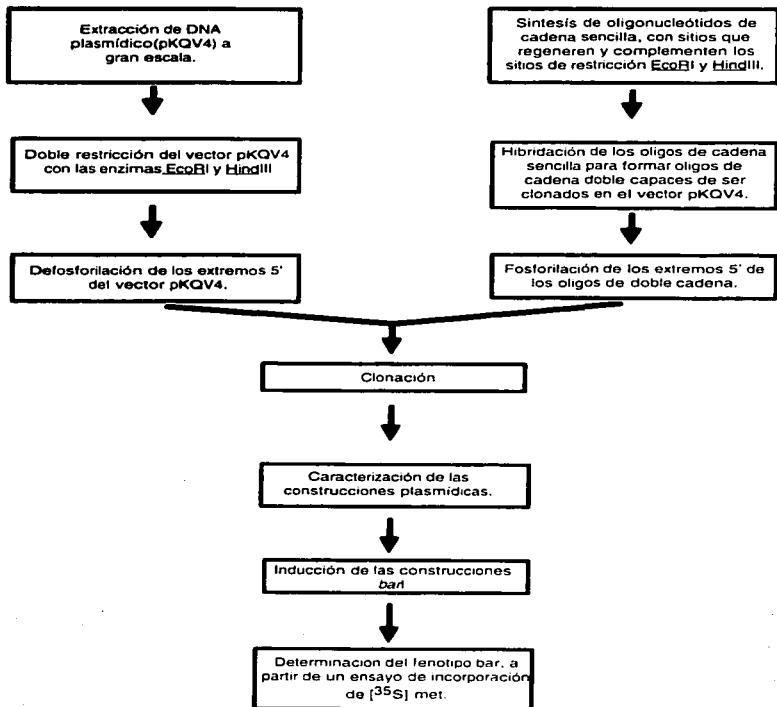


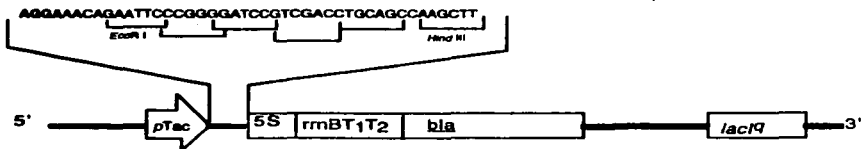
Figura 4. Estrategia Metodológica.

**TABLA 2**  
**Cepas de *E. coli* K12**

Nombre de la cepa	Genotipo relevante	Procedencia
DH5 $\alpha$	rec A1 <del>end</del> A1 hsd R17( $\gamma$ - , $\gamma$ +) rel A1 <del>deoR</del> ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Comercial
N5960	SA500 <i>his ilv lacZ</i> $\alpha$ 21 ( $\lambda$ d857V Bam <i>Nam7 Nam53 H1</i> ) <i>CysH:: Tn5 relA</i> <sup>+</sup>	Comercial
GG5960	N5960( <i>pth</i> ) <i>rap</i> <sup>a</sup>	Guameros et al 1987
PC90	$\Delta$ <i>lac pro</i>	
FM95	PC90 <i>rap</i> <sup>b</sup>	Fidel M.

<sup>a</sup> obtenida por cotransducción de *rap* con Tn10 usando un lisado crecido en la cepa C600 rap fad:: Tn10.

<sup>b</sup> obtenida por transducción por P1*vir*



**Figura 5. Esquema lineal del vector pQV4.**

El vector de expresión pQV4 es usado para la sobreexpresión de genes. Contiene al promotor *Tac* el cual, es regulado por el producto del gen *lacI<sup>q</sup>* inducido por la adición de isopropoil- $\beta$ -D-tiogalactosido (IPTG) al medio. Inmediatamente río abajo del promotor esta el sitio de clonación múltiple (MCS) y el terminador ribosomal *rmB*. Los genes que contengan un sitio de unión a ribosomas y un codón de inicio ATG pueden ser expresados si se insertan en los sitios *Pst* I o *Hind* III. El sitio de unión a ribosomas del plásmido puede ser utilizado para expresar insertos clonados entre los sitios *Eco*R I y *Sma* I cuando el codón de inicio del gen se encuentra entre 10 a 15 pares de bases del sitio de unión a ribosomas.

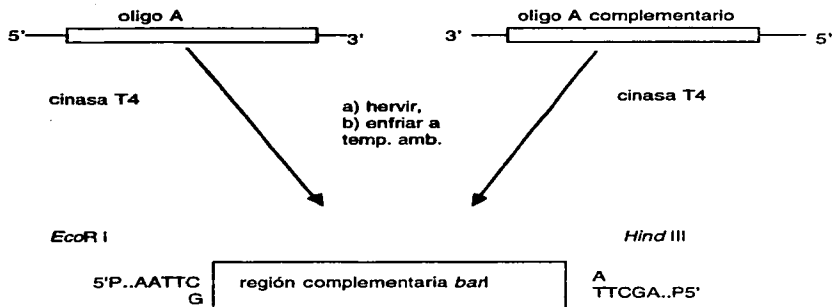
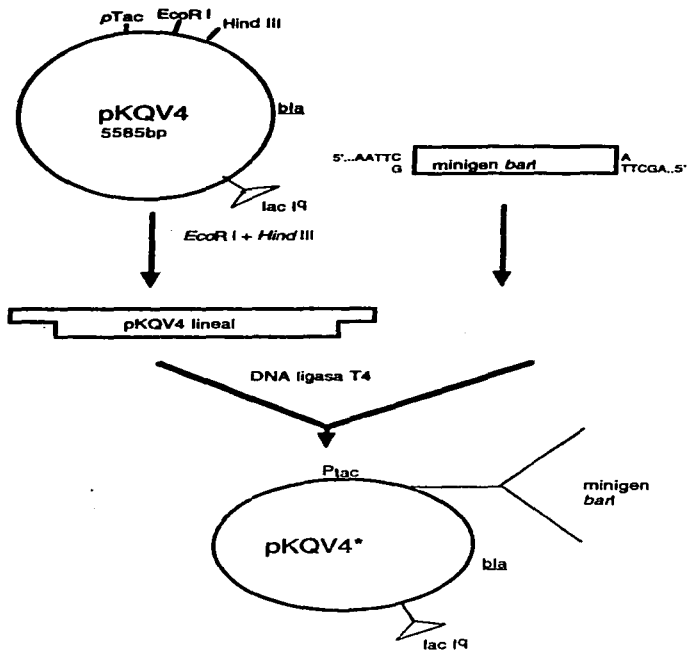


Figura 6. Los oligonucleótidos de doble cadena necesarios para la clonación, se pueden obtener hibridando dos oligonucleótidos de cadena sencilla que se han sintetizado químicamente. Generalmente tales oligos son fosforilados con la cinasa T4 antes de la reacción de hibridación. Los oligonucleótidos contienen secuencias específicas que regeneran los sitios de restricción *Eco R I* y *Hind III* en el DNA de doble cadena, como se indica en la figura.



**Figura 7.** Clonación de los oligodeoxinucleótidos sintéticos con cambios en las señales de traducción del minigen *bar1*. El plásmido vector fue digerido con las enzimas *EcoR I* y *Hind III*. El fragmento mayor el cual lleva la región promotora inducible, será ligado al oligonucleótido sintético de cadena doble previamente fosforilado y flanqueado por las regiones que complementan los sitios de restricción. Se indican en negrillas los nucleótidos que complementan y regeneran los sitios de reconocimiento por enzimas de restricción.

#### **4. Caracterización de las construcciones.**

Las construcciones producidas serán secuenciadas por el método de terminación de la cadena (Sanger *et al*, 1977), empleando como *primer* un oligo sobre la secuencia del vector. Un método alternativo es la hibridación de DNA de las construcciones en un ensayo tipo *dot-blot*, con el mismo oligo empleado para su clonación (Méndez-Canseco, 1994).

#### **5. Análisis del fenotipo de las construcciones.**

El efecto de las mutaciones en *bar* será analizado tras la inducción con el inductor gratuito IPTG. La primera aproximación al análisis de los fenotipos será sobre el crecimiento celular. En base a los resultados que se obtengan, se elegirán los ensayos más convenientes para obtener información más específica. El fenotipo puede determinarse a partir de los siguientes ensayos:

- a) Cinética de viabilidad,
- b) Incorporación de [<sup>35</sup>S] metionina,

### **3.1 ESTRATEGIA METODOLOGICA**

Para realizar el proyecto propuesto, se diseñarán oligonucleótidos basados en la secuencia del minigen *barI*, y se clonarán bajo el control del promotor inducible *pTac*, en el vector pKQV4 (Strauch *y col*, 1989). Una vez que se evalúe la capacidad de esta construcción para inhibir la viabilidad de células *pth*, se diseñarán construcciones análogas que introduzcan las modificaciones en *barI* descritas en la Tabla 3. Los cambios propuestos complementarán el análisis de mutaciones ya estudiadas. Por ejemplo, la Tabla 1 muestra que existen dos mutaciones en la secuencia S-D que disminuyen la eficiencia de éste, y afectan



Tabla 3. Mutaciones propuestas para analizar los elementos de la secuencia del minigen *bar1* que están involucrados en con su efecto lóxico. Las letras en negritas dentro de la secuencia indican los cambios propuestos.

Secuencia	Características/efecto	Nombre
5'-AAG CTG AAC GAG AAA CGT AAA ATG ATA TAA ATA TCA ATA. 3'		WT
5'-AG GAA ACA GAA TTC ATG ATA TAA ATA. 3'	Contiene los sitios de restricción EcoRI y Hind III. Utiliza como S-D la secuencia del vector.	E-H barWT
5'-AG GAA ACA GAA TTC ATA ATA TAA ATA. 3'	Contiene los sitios de restricción EcoRI y Hind III. Utiliza como S-D la secuencia del vector. Contiene un codón de inicio de muy baja eficiencia.	E-H bar101
5'-AAG CTG AAG GAG GAA CGT AAA ATG ATA TAA ATA TCA ATA. 3'	Contiene el consenso S-D.	SuperbarG719, G715
5'-AAG CTG TTC CTC CAC CGT AAA ATG ATA TAA ATA TCA ATA. 3'	Se ha eliminado el consenso S-D y se ha adicionado un secuencia que no funciona como S-D.	bar-antiS-D
5'-AAG CTG AAC GAG AAA CGT AAA GTG ATA TAA ATA TCA ATA. 3'	Contiene un codón de inicio que funciona con una eficiencia intermedia entre los codones AUG y AUA.	barG706
5'-AAG CTG AAC GAG AAA CGT AAA ATG NNN TAA ATA TCA ATA. 3'	Cambia el codón que especifica para lle por algún otro con contenido rico en G, C o U y que sean reconocidos por isoformas escasas en la célula.	bar701-703
5'-AAG CTG AAC GAG AAA CGT AAA ATG (ATA) <sub>n</sub> TAA ATA TCA ATA. 3'	Aumenta el tamaño del ORF con codones ATA o AAA.	barextendido
5'-AAG CTG AAC GAG AAA CGT AAA ATG ATA TAG ATA TCA ATA. 3'	Sustitución del codón de terminación silvestre por el codón UAG que también es señal de terminación, pero se ha reportado es eficiente en el contexto apropiado.	barG699

negativamente a la función Bar; la mutante G719 y G715 propuesta en la Tabla 2 originaría una secuencia S-D propiamente consenso, que estimularía la formación de complejos de iniciación, y por lo tanto aumentaría el efecto Bar. El efecto contrario se lograría si se modifican las señales S-D y la región espaciadora por la secuencia del rRNA16S (5'-CACCUCCUU-3'). Si la secuencia S-D y la región espaciadora debe ser reconocida por el rRNA 16S como parte de una señal traduccional(Steitz, J.A. 1977., Schneider, T. D. y col., 1986), una secuencia similar a la del rRNA 16S tendría pocas probabilidades de ser reconocida como tal, pues presentaría una homología que le impediría interactuar (mutación anti-S-D, Tabla 3).

Se ha propuesto que el codón AUA también puede funcionar como un codón de inicio, pero con una eficiencia muy baja (Buckingham, K. y col., 1987). La mutación *barA704* (*bar101*; Guzmán y col.,1989) cambia el codón AUG por un codón AUA. Esta mutante inactiva a la función Bar. Sin embargo, experimentos de fraccionamiento celular demuestran que el RNA con esta mutación aún tiene capacidad de unirse a los ribosomas 70S (Ontiveros, C. y Valadez, G., en publicación). La mutación G706 generaría el codón de inicio GUG, cuya eficiencia para promover el inicio de la traducción es intermedio entre el codón AUA y el codón AUG (Buckingham, K. *et al*, 1987; Hartz *et al*, 1991). La mutación *barG703* cambia el codón raro de isoleucina por un codón que especifica valina . Esta mutación abole el efecto Bar completamente (Valadez, G. en publicación). Esto da lugar a la pregunta ¿Es la naturaleza de las bases que constituyen a los codones importantes para el fenómeno tóxico? Las

mutaciones en el codón codificantes que son tóxicas, corresponden a bases que mantienen interacciones codón-anticodón que podrían ser débiles, p.e. AUA con UAU, en el codón silvestre, o AAA con UUU, en la mutación *barA702*. Es raro que la mutación *barG703*, que genera al codón GUA, no sea tóxica. Esto sugeriría que la caída del dipeptidil-tRNA propuesta en el modelo descrito arriba, podría estar acentuada en interacciones codón-anticodón ricas en A. Si en el codón GUA la interacción es más fuerte, se reduciría la caída del dipeptidil-tRNA y probablemente la terminación ocurriría de forma normal. Para evaluar esta posibilidad, se propone generar mutaciones que den lugar a codones ricos en G o C, o ricos en U, p. ej. UUU (Phe) y UUC (Phe) (ver Tabla 2).

Se ha propuesto en el modelo de inhibición mediado por *bar*, que uno de los factores importantes a este respecto es la titulación del isoaceptor tRNA<sup>Leu</sup><sub>AUA</sub>. Es necesario entonces medir la toxicidad relativa de *bar* cuando se aumente el mini-ORF con más de un codón del tipos AUA y AAA (ver el minigen extendido en la Tabla 3). Se propone también generar mutaciones que especifiquen para isoleucina, pero en codones abundantes. Por último, se propone una mutación que cambie al codón de paro natural del minigen por el codón UAG que también funciona como señal de paro pero con una eficiencia diferente, dependiente del contexto (Björnsson, A. y Mottagul, S. 1996; Major, L. y Poole, E. 1996).

## GLOSARIO

- A** : Base purica adenina.
- AUA** : Codón que especifica para isoleucina.
- AAA** : Codón que especifica para lisina.
- attB** : Sitio de unión de la bacteria
- attP** : Sitio de unión del fago.
- Bla** : Proteína Bla; confiere resistencia al antibiotico ampicilina.
- barI** : Blanco de acción de rap I; sitio en el genoma de lambda que contrarresta la mutación rap.
- barII** : Blanco de acción de rap II; sitio en el genoma de lambda que contrarresta la mutación rap.
- CI** : Proteína represora que mantiene la lisogenia del bacteriófago lambda.
- ci** : Gen que codifica para la proteína represora CI.
- DNA** : Acido deoxirribonucleico.
- E. coli** : Escherichia coli.
- EcoRI** : Enzima de restricción ECoRI.
- HindIII** : Enzima de restricción HindIII.
- int** : Gen de la integrasa del bacteriófago lambda.
- IPTG** : Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido.
- L-agar** : Medio de cultivo luria-agar.
- LB** : Medio de cultivo Luria-Broth.
- Lit** : Proteína Lit, proteasa especifica para el factor de elongación -Tu (EF-Tu). Involucrada en el mecanismo de exclusión tras la infección con el fago T4.
- mRNA** : RNA mensajero.

**pb** : Pares de bases.

**pL** : Promotor de Lambda.

**pKQV4** : Vector de sobre-expresión de proteínas (ver figura 5).

**Prr** : El elemento prr contiene al gen prrC, que codifica para una ribonucleasa específica para el tRNA de lisina del huésped. Involucrada en el mecanismo de exclusión tras la infección con el fago T4.

**pTac** : Promotor del gen Tac.

**Pth** : Peptidil tRNA hidrolasa; proteína que hidroliza peptidil-tRNAs para dar péptidos y tRNAs libres.

**rap** : Mutante de E. coli que no permite la propagación del bacteriófago lambda con un sitio attP silvestre.

**RNA** : Ácido ribonucleico.

**rRNA** : RNA ribosomal.

**rrnB** : Terminador del operón ribosomal.

**S-D** : Secuencia Shine and Dalgarno; señal de inicio de la traducción.

**sib** : Mutación en el extremo 3' del gen de la integrasa del bacteriófago lambda que afecta la estabilidad del mRNA de bar.

**tl** : Terminador de la transcripción del gen int.

**tRNA** : RNA de transferencia.

**xls** : Gen de excisión del bacteriófago lambda.

## **Bibliografía**

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

Björnsson, A., Mottagui-Tabar, S. y Isaksson, L. A. Structure of the C-terminal end of the nascent peptide influences translation termination. 1996. *EMBO J.* **15**, 1696- 1704.

Buckingham, K., Chung, D. G., Neilson, T. y Ganoza, M. C. Recognition of translational termination signals. 1987. *Biochimica et Biophysica Acta.* **909**, 92-98.

Bult, C. J., White O. *et al.* Complete Genome Sequence of the Methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. 1996. *Science.* **273**, 5278, 1058-1072.

Cuzin, F., Kretchmer, N., Greenberg, R.E., Hurwitz, R. y Chapeville, F. Enzymatic hidrolisis of n-substituted aminoacyl-tRNA. 1967. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **58**, 2079-2086

De la Vega, F. M., Galindo J. M., Old I.G. y Guarneros, G. Microbial of the C-terminal end the nascent peptide influences translation termination. 1996. *Gene*, **169**, 97-100.

Echols, H., *Developmental Pathways For The Temperature Phage: Lysis*

vs Lysogeny. 1972. *Ann. Rev. Genet.* **6**, 157.

Echols, H. y Guarneros, G. 1983. En: *Lambda II: Control of Integration and Excision*. ED. Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 75-92.

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

García-Villegas, M. R. 1988. Obtención y caracterización de mutantes *barII* del bacteriófago lambda. Tesis de Maestría. Dpto. Genet. Mol. Biol. CINVESTAV IPN.

Guzmán, P. y G. Guarneros. Phage Genetics Sites Involved in  $\lambda$  Growth Inhibition by the *Escherichia coli rap* Mutant. 1989. *Genetics* **121**, 401-410.

Guzmán, P., Rivera-Chavira, B.E., Court, D.L. Gottesman, M.E. y Guarneros G., Machado, G. y Garay, E. Transcription of a Bacteriophage  $\lambda$  DNA Site Blocks Growth of *Escherichia coli*. 1990. *J. Bacteriol.* **172**, 1030-1034.

Guarneros, G., Montañez, C., Hernández, T. y Court, D. Posttranscriptional control of bacteriophage  $\lambda$  *int* gene expression from a site distal to the gene. 1982. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **79**, 238-242

Hartz, D. McPheeters, D.S. y Gold L. Influence of mRNA Determinants on Translation Initiation in *Escherichia coli*. 1991. *J. Mol. Biol.*, **83**-97.

Henderson, D. and Weil. A Mutant of Escherichia coli that Prevents Growth of Phage Lambda and Is Bypassed by Lambda Mutants in a Nonessential Region of the Genome. J. 1976. Virology. 71, 546-559.

Hernández, J., Ontiveros, C., Valadez, G., y Guarneros, G. 1996. Meeting on Molecular Genetics of Bacteria and Phages. ED. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

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

Heurgué-Hamard, V., Mora, L., Guarneros, G. y Buckingham. R. H. The growth defect in E. coli deficient in peptidyl-tRNA hidrolase is due to starvation for lys tRNA (lys).1996. The EMBO J. 11, 2826-2833.

Inokuchi, H. & Yamao, F. 1995. En: tRNA: Structure, Biosynthesis and Function. Söll, D. y RajBhandary, U.L., eds. American Society for Microbiology Press, Washington, pp. 17-30.

Major L.L., Poole, E.S., Dalphin, M.E., Mannering, S.A. y Tate, W.P. 1996. Nucleic acids R. 24, 2673-2678.

Méndez-Canseco, R.F. y Guarneros, G. 1996. Meeting on Molecular Genetics of Bacteria and Phages. ED. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. USA.



**Méndez-Canseco, R. 1994. Análisis del efecto de mutaciones en las regiones *sib* y *bar* en la exclusión de plásmidos en *Escherichia coli* rap. Tesis de Maestría. Dpto. Genética y Biol. Mol. CINVESTAV-IPN.**

**Montañez, C., Bueno, J., Schmeissner, U., Court, D.L. y Guarneros, G. Mutations of bacteriophage lambda that define independent but overlapping RNA processing and transcription termination sites. 1986. J. Mol. Biol. 191, 29-37.**

**Pérez-Morga D. y Guarneros, G. A Short DNA Sequence from  $\lambda$  Phage Inhibits Protein Synthesis in *Escherichia coli* rap.1990. J. Mol. Biol. 216, 243-250.**

**Rivera-Chavira, B.E., Delimitación de la región *bar* la del DNA del bacteriófago lambda.1989. Tesis Doctorado. Dpto. Genet. Biol. Mol. CINVESTAV-IPN.**

**Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. USA.**

**Sanger, F.S., Nicklen, S. y Coulson, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibition.1977. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.**

**Schneider, T. D., Stormo, G. D y Gold, L. Information context of binding sites on nucleotide sequences. 1986. J. Mol. Biol. 188, 415-431.**

**Snyder L. Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents?1995. Mol. Microbiol. 15, 415-420.**

Steitz, J.A. Wahba, A. J., Laughrea, M. y Moore, P. Differential requirements for polypeptide chain initiation complex formation at the three bacteriophage R17 initiator regions. 1977. Nucl. Acids Res. **4**, 1-15.

Strauch, Mark. A., Spiegelman, G.B., Pereep, M., Johnson, W. C., Burbuly, D. and Iloch, J.F. The transition state transcription regulator abrB of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. 1989. EMBO J. **8**, 1615-1621.

Tenson, T. y Mankin, A. Comparison of functional peptide encoded in the *Escherichia coli* 23S rRNA with other peptides involved in cis-regulation of translation. 1995. Biochem. Cell Biol. **73**, 1061-1070.

Velázquez, J. F. Retrorregulación positiva del gen *int* del bacteriófago lambda por el terminador de la transcripción  $\lambda$ . 1992. Tesis Doctoral. Depto. Genet. Biol. Mcl. CINVESTAV-IPN.

Weisberg, R.A., Gottesman, S. y Gottesman, M.E. 1977. Bacteriophage lambda; The lysogenic pathway. En "Comprehensive Virology" ED. Fraenkel, H., Conrat. and Wagner, E. R. **8**:197. Plenum Press, N.Y.