

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

DEPTO. DE BIOLOGIA MOLECULAR

*EL CONTROL DE LA LISIS/LISOGENIA DEL BACTERIOFAGO  
LAMBDA: OBSTRUCCION ENTRE LOS PROMOTORES pR Y pcin.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

Biol. BENITO ESTRADA MENA

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

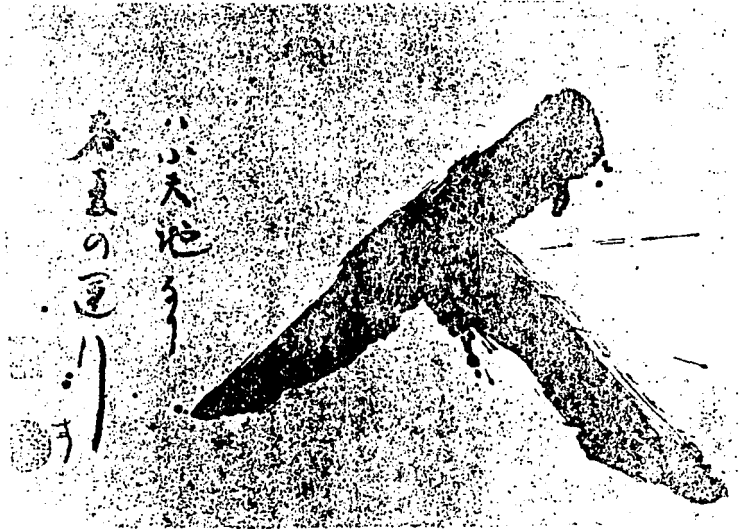


## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

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

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

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



Representación del ideograma chino correspondiente a <<hombre>>  
(Caligrafía de Jiun, Japon, siglo XVIII).

No debemos dejar de explorar,  
y al final de toda nuestra exploración  
llegaremos a donde empezamos  
y conoceremos el lugar por primera vez.

T.S. Elliot

Este trabajo se realizó en el laboratorio  
del Dr. Gabriel Guarneros del depto. de  
Genética y Biología Molecular del Centro  
de Investigaciones y de Estudios Avanzados  
del I.P.N.

A Margarita

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Guarneros por haberme permitido desarrollar este trabajo; por las discusiones y enseñanzas recibidas y sobre todo, por la formación de como plantear e interpretar los experimentos y la revisión de esta tesis.

A las Dras. Carmen Gómez y Cecilia Montañez por haber formado parte de mi Comité Tutorial y por sus comentarios.

A los Doctores David Romero, Laura Camarena, Luis Servín y Roberto Hernández por la revisión crítica y sus comentarios del presente trabajo.

A Javier, Ceci, Luis, P. Antonio, J. Manuel, Tere, José, Ale, Victor, Bulmaro y Don Arnulfo por su asistencia técnica, comentarios y discusiones.

Al Sr. Perez de la Mora por su amable trato.

A mi familia: Hortencia, Benito, Javier, Israel, Araceli, Roberto, Roberto Jr. y Yasmin por su compañía.

A Margarita, Laura, Martha y S. Tesshin por ayudarme a abrir la grieta.

## INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	I
INDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	15
ESTRATEGIA	16
MATERIAL Y METODOS	19
Medios de cultivo y soluciones.	19
Condiciones de plaqueo.	20
Propagación de fagos por infección.	21
Método para la construcción de fagos recombinantes.	21
Complementación por estría para lisogenia.	22
Ensayo de placa roja.	22
Mutagénesis.	22
Cruzas líticas.	23
Ensayo de superinfección.	24
Frecuencia de lisogenia.	25
Tasa de eclosión.	26
Obtención de lisados concentrados del bacteriófago lambda.	26
Extracción del DNA del bacteriófago lambda.	27
Aislamiento de DNA plasmídico.	28
Preparación de células competentes.	29
Transformación de <u>Escherichia coli</u> con DNA plasmídico.	29
Corte de DNA plasmídico con enzimas de restricción.	30
Cuantificación de unidades de galactocinasa.	30
Extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.	31
CONSTRUCCION DE PLASMIDOS	37
Plásmidos pOPC0, pOPC1, pOPC4, pOPC10 y pOPC3.	37
Plásmidos pOPC recombinantes de la región del auto represor.	37
Plásmidos pAPC0 y pAPC1.	37
Plásmidos pPR0 y pPR1.	38
Plásmidos pOO1, pOO2, pPP1 y pOR1.	38
RESULTADOS	49
1. AISLAMIENTO DE MUTANTES CON FENOTIPO Sib-.	
a) Selección de mutantes por el ensayo de placa roja.	49



II. CARACTERIZACION DE FAGOS MUTANTES <u>opc</u> .	51
a) Fenotipo en <u>ihf+</u> e <u>ihf-</u> .	51
b) Complementación en <u>ihf-</u> de fagos <u>cin-</u> y <u>opc-</u> .	54
c) Ensayo de placa roja en <u>himA-</u> .	57
d) Actividad de integrasa.	57
e) Frecuencia de lisogenia.	59
f) Tasa de eclosión.	61
III. MAPEO INICIAL DE LAS MUTACIONES <u>opc</u> .	
a) Mapeo genético.	63
b) Mapeo por fásmidos (recombinación entre fagos y plásmidos).	69
c) Mapeo por intercambio de los fragmentos de restricción Aval-Aval entre los plásmidos pOPC0, pOPC1 y pOPS3.	72
IV. EFECTO DE LAS MUTACIONES <u>opc</u> y <u>cin</u> SOBRE LAS INTERFERENCIAS TIPO A Y B.	75
a) Interferencia de plásmidos pOPC y sus derivados.	75
b) Interferencia de plásmidos sin la región del autorepresor.	78
c) Efecto de las mutaciones <u>opc4</u> y <u>opc10</u> en la interferencia y su comparación con <u>opc1</u> .	80
d) La participación de las secuencias del origen en la interferencia tipo B.	80
V. ACTIVIDAD DEL PROMOTOR <u>pr</u> CON LA MUTACION <u>opc1</u> .	82
VI. EFECTO DE LAS MUTACIONES <u>cin1</u> Y <u>opc1</u> SOBRE EL MANTENIMIENTO DE LOS PLASMIDOS EN CEPAS <u>ihf-</u> .	86
<b>DISCUSION</b>	88
<b>CONCLUSIONES</b>	103
<b>PERSPECTIVAS</b>	104
<b>REFERENCIAS</b>	105

## INDICE DE TABLAS

NUMERO		PAGINA
A	Cepas bacterianas utilizadas.	33
B	Mutaciones del fago utilizadas.	35
1	Selección de mutantes <u>opc</u> por el ensayo de placa roja.	50
2	Fenotipo de mutantes <u>opc</u> .	52
3	Complementación para represión de fagos <u>opc-</u> .	55
4	Ensayo de placa roja en una cepa <u>himA-</u> de fagos <u>opc-</u> .	58
5	Eficiencia de las mutantes <u>opc</u> para promover recombinación integrativa.	60
6	Frecuencia de lisogenia de mutantes <u>opc</u> .	62
7	Tasa de eclosión de mutantes <u>opc</u> .	64
8	Prueba de rescate de la mutación <u>opc1</u> por medio de fásmidos.	70
9	Mapeo de la mutación <u>opc1</u> por intercambio del fragmento de restricción <u>AvaI-AvaI</u> entre los plásmidos <u>pOPC0</u> , <u>pOPC1</u> y <u>pOPS3</u> .	74
10	Eficiencia de plaqueo de diferentes fagos en cepas que llevan los plásmidos con las regiones <u>opc+</u> y <u>opc-</u> .	76
11	Interferencia de los plásmidos <u>pAPC0</u> y <u>pAPC1</u> , que carecen de la región del autorepresor sobre el desarrollo de los fagos.	79
12	Efecto de las mutaciones <u>opc4</u> y <u>opc10</u> en la interferencia y su comparación con <u>opc1</u> .	81
13	Participación de los sitios <u>oop</u> , <u>ice</u> y <u>ori</u> en la interferencia tipo B.	83
14	Actividad del promotor <u>pR</u> con la mutación <u>opc1</u> .	85
15	Efecto de las mutaciones <u>cin1</u> y <u>opc1</u> sobre el mantenimiento de los plásmidos en cepas <u>inf-</u> .	87

## INDICE DE FIGURAS

NUMERO		PAGINA
1	Ciclo de vida del bacteriófago $\lambda$ .	3
2	Sitios de unión de CI y Cro.	5
3	Los promotores que activa coordinadamente CII.	7
4	Regulación de la expresión del gene <u>int</u> .	9
5	Estructuras genéticas del bacteriófago y del plásmido $\lambda$ dv.	11
6	Los circuitos regulatorios y la representación esquemática del genoma de $\lambda$ dv.	13
7	Ensayo de placa roja.	18
8	Plásmidos pOPC.	39
9	Patrón de restricción del DNA de los fagos <u>opc</u> <u>cin</u> .	40
10	Patrón de restricción de los plásmidos pOPC0 y pOPC1.	41
11	Patrón de restricción de los plásmidos pOPC4 y pOPC10.	42
12	Plásmidos pAPC.	43
13	Patrón de restricción de los plásmidos pAPC0 y pAPC1.	44
14	Plásmidos pPR.	45
15	Patrón de restricción de los plásmidos pPR0 y pPR1.	46
16	Plásmidos derivados de la región del origen.	47
17	Patrón de restricción del plásmido pOO2.	48

18	Mapeo genético de <u>opc</u> - con respecto a <u>att</u> .	66
19	Mapeo genético de <u>opc</u> - con respecto a <u>bio</u> y <u>ci</u> .	67
20	Comparación de la región core de los plásmidos dv, $\lambda_{imm434}$ , $\lambda_{imm21}$ .	92
21	Transcripción convergente entre los promotores <u>pR</u> y <u>pE</u> del bacteriófago lambda.	101

## RESUMEN

En el presente trabajo, se reporta el aislamiento de mutantes opc que exhiben un fenotipo similar a mutantes sib en el ensayo de placa roja y que revierten el efecto de la mutación cin1 en fagos y plásmidos en cepas IHF-. Por estudios de mapeo genético y de restricción, así como por estudios funcionales con fagos y plásmidos, las mutaciones se localizaron en la región **pRoR** y de acuerdo a los resultados presentados, incrementan la constitutividad de éste. Asimismo se presentan evidencias que sugieren una obstrucción entre los promotores **pR** y **pcin**. Se discuten posibles implicaciones de este hallazgo.

## INTRODUCCION

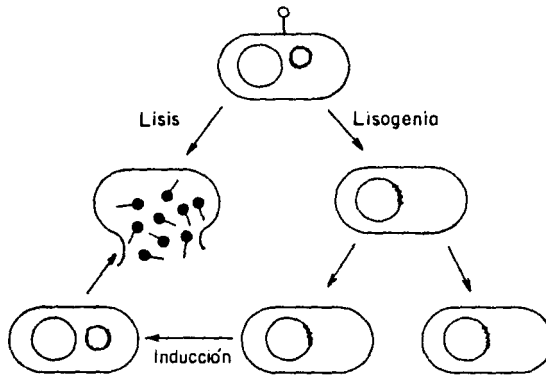
El potencial del bacteriófago lambda, de seguir un estilo de propagación lítico ó uno lisógeno, probablemente evolucionó como una respuesta adaptativa a las fluctuaciones de los hábitats de su hospedero *Escherichia coli*. Esta conducta permite al fago responder a condiciones ambientales que le confieran una ventaja selectiva (Miller, 1981, Friedman y Gottesman, 1983).

La respuesta lítica capacita al fago para replicarse, empaclar su DNA y producir progenie; esta respuesta es más productiva cuando el hospedero crece en abundancia de nutrientes. El modo lisógeno permite la perpetuación del genoma del fago por asociación estable con el cromosoma bacteriano, sobre todo en condiciones de crecimiento pobre (fig. 1) (Grozicker et al, 1972; Kourilsky, 1973; para una revisión ver Herskowitz y Hagen, 1980).

Para que ocurra la Lisis ó la Lisogenia, en gran medida influye la multiplicidad de infección (mdi: número promedio de fagos que infectan a una célula). A multiplicidades bajas (0.1) el fago entra en el ciclo lítico; mientras que a multiplicidades altas (10) se favorece el ciclo lisógeno (Kourilsky, 1973).

Teleonómicamente, un número bajo de fagos con respecto al número de bacterias, significa un gran suplemento de hospederos para el desarrollo lítico; mientras que un número alto de fagos indica una inminente pérdida de nuevos hospederos para propagarse líticamente (equilibrio en un sistema depredador-presa).

El genoma del fago lambda codifica para 2 proteínas represoras



**Fig. 1. Ciclo de vida del bacteriófago lambda.**- En la figura se ilustran las respuestas de la infección de la bacteria *Escherichia coli* por el fago lambda. En la respuesta lítica el DNA del fago se replica y produce progenie que se libera al medio. En la lisogenia se reprimen las funciones virales y el DNA del fago se asocia al DNA bacteriano. En esta forma se llama profago y es perpetuado en la bacteria por un número indefinido de generaciones. Eventualmente, las funciones del profago se desreprimen, el DNA viral se libera y entra en la respuesta lítica.

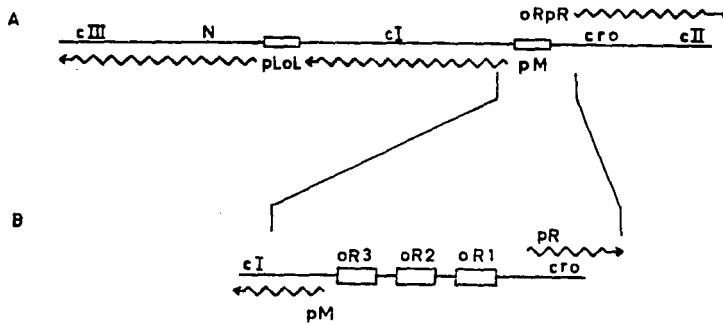
que tienen funciones esenciales, pero que son antagónicas en el tipo de regulación que ejercen para el desarrollo del fago. El producto del gene cI se requiere para la lisogenia; mientras que el producto del gene cro se necesita durante el desarrollo lítico. El represor CI apaga la transcripción de los genes tempranos que incluyen a cro y adicionalmente enciende la transcripción de cI. Para permitir el desarrollo lítico, Cro realiza 2 funciones negativas: Impide la transcripción que estimula CI y abate la de los genes tempranos (Herskowitz y Hagen, 1980).

Ambos represores compiten para unirse a 2 regiones operadoras en el genoma del fago (oL y oR). Cada una de estas regiones consiste de 3 sitios de unión para los represores, los cuales tienen diferente afinidad para cada uno de los sitios. La forma en que se utilizan estos sitios por las proteínas Cro y CI, sirve como interruptor entre las rutas lítica y lisogénica (fig. 2; Ptashne et al, 1980).

El establecimiento de la lisogenia requiere de la síntesis de 2 funciones del fago: El represor (CI) que inhibe la transcripción de las funciones líticas y la integrasa (Int) que cataliza la recombinación entre el DNA viral y el DNA bacteriano.

La proteína CII (codificada en el genoma del fago) activa coordinadamente la expresión de los genes del represor (cI) y de la integrasa (int), a partir de los promotores pE y pI respectivamente (fig.3) (Reichardt y Kaiser, 1971; Echols y Green 1971; Katzir et al, 1976; Jones et al, 1979; Hoess et al, 1980; Schmeissner et al, 1980; Abraham et al, 1980). Una vez que la represión se establece,





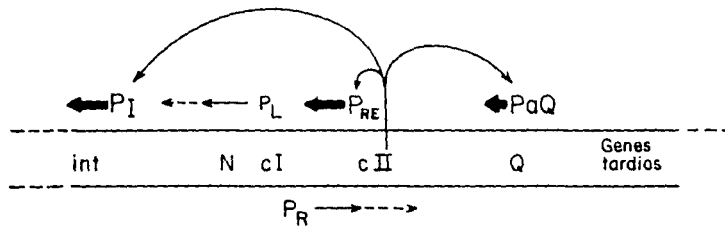
**Fig. 2. Sitios de unión de *Ci* y *Cro*.**- (A) Una porción del genoma del fago lambda. Las flechas indican las direcciones y los puntos de inicio de la transcripción de varios genes. *pLoL* y *pRoR* son las regiones promotor-operador izquierdo (L) y derecho (R). (B). Diagrama expandido del operador *oR*. *oR1*, *oR2* y *oR3* son los sitios de unión (de 17 pb de largo cada uno) de *Ci* y *Cro*. Los sitios del inicio de la transcripción de *pR* y *pM*, son señalados. Las afinidades en orden decreciente para los represores son: para *Ci*,  $o1 > o2 > o3$  y para *Cro*,  $o3 > o2 > o1$ .

la transcripción del gene cI se inicia en el promotor **PM**, que regula positivamente el represor CI (fig. 2; Ptashne et al, 1980). La proteína CII también ejerce una regulación negativa sobre las funciones líticas (McMacken et al, 1970; Court et al, 1975).

La estabilidad de la proteína CII es controlada por los productos génicos de hflA (bacteriano) y de cIII (fágico). La proteína Hfl A facilita la degradación de CII, mientras que CIII protege a CII (Belfort y Wulff, 1973a y b y 1974; Hoyt et al, 1982). La síntesis de CII está bajo control positivo (a nivel postranscripcional) por los productos de los genes bacterianos himA y himD que conforman a la proteína IHF (Miller, 1981; Hoyt et al, 1982).

Así CII puede ser la función clave para la separación inicial entre las 2 rutas de desarrollo. La actividad de CII, sólo se manifiesta a multiplicidades de infección altas.

La integración del DNA del fago en el cromosoma bacteriano esencialmente ocurre por el mecanismo propuesto por Campbell (1962). El DNA de Lambda se circulariza después de la infección y la recombinación se realiza entre sitios específicos att de los DNAs (PoP', en el fago y BoB', en la bacteria). La reacción de recombinación es mediada por la proteína Int (Zissler, 1967; Gingery y Echols, 1967; Gottesman y Yarmolinsky, 1968). La inducción del profago resulta de la desrepresión y escisión del DNA viral del cromosoma bacteriano. La reacción de escisión requiere de las proteínas Int y Xis (Gingery y Echols, 1967; Gottesman y Yarmolinsky, 1968; Kaiser y Masuda, 1970; Guarnero: y



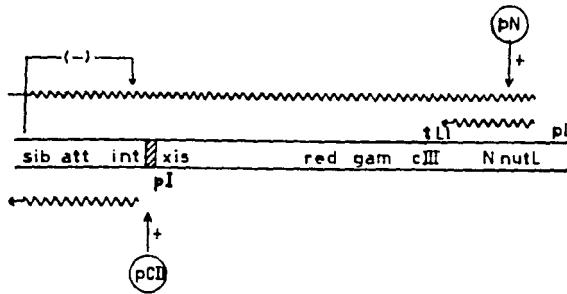
**Fig. 3. Los promotores que activa coordinadamente CII.** Diagrama que muestra la activación coordinada de los promotores  $p_I$ ,  $p_E$  y  $p_Q$  por la proteína CII. Las flechas horizontales indican el origen y la dirección de la transcripción de varios promotores. Ver el texto para otros detalles.

Echols, 1970). Adicionalmente ambas reacciones requieren de los productos bacterianos HimA y Hip (IHF) (Miller y Friedman, 1980; Miller y Nash, 1981).

El gene int además de transcribirse a partir del promotor pI (cuando este se activa por CII, ver más arriba) también se transcribe a partir del promotor pL, cuando este se activa por la proteína N. Sin embargo, en contraste a los niveles altos de Int que se producen del transcrito de pI, se producen niveles reducidos del transcrito de pL. Esta inhibición es postranscripcional y se efectúa en cis por sib (sitio inhibidor en b) que se localiza distal a int (fig. 4). A este tipo de inhibición se le ha denominado retroregulación (Schindler y Echols, 1981; Guarneros et al, 1982). Adicionalmente a la región sib, se requiere para este tipo de regulación de la RNasa III, endonucleasa de E.coli que probablemente procesa el RNAm en sib. Mutaciones en sib ó en RNasaIII son deficientes en la inhibición.

EL sitio sib puede ser vital para la regulación temporal de la lisogenia, ya que evita integración temprana en ausencia de represión que podría ser letal para el hospedero. En el estado de profago, sib queda separado de int por el evento de integración. La inducción se realiza en condiciones Sib-, asegurando la expresión de Int y Xis para una escisión rápida del profago (Guarneros y Galindo, 1979; Schindler y Echols, 1981; Guarneros et al, 1982; para una revisión ver Echols y Guarneros, 1983).

El operón pR, además de contener los genes cro, gII y Q que intervienen en el control de la Lisis/Lisogenia, contiene los genes



**Fig. 4. Regulación de la expresión del gene *int*.** Después de la infección, la transcripción (líneas onduladas) que se inicia en *pI* termina en *tL1*. La proteína *N* elimina la terminación (+) prolongando el transcrito hasta la región *b*. El sitio *sib* inhibe (-) la traducción del mRNA de *int*. Posteriormente, La proteína *CII*, activa la transcripción de *pI* (+). Este transcrito incluye a *int*, pero no a *xis*; *sib* no afecta la traducción de *int* del transcrito de *pI*.

y sitios necesarios para la replicación del DNA viral. Una aproximación para entender la regulación de este proceso se ha llevado acabo con el plásmido  $\lambda$ dv (Matsubara, 1981).

El plásmido  $\lambda$ dv es un fragmento derivado del genoma del bacteriófago  $\lambda$  que consiste de genes y sitios que toman parte en el proceso de la replicación y su regulación (región "core"); y se encuentran arreglados en el siguiente orden: **pRoR-cro-tR1-cII-O-P** (fig. 5). A su vez el replicón puede dividirse en dos regiones separadas por **tR1**, la del autorepresor que contiene a **pRoR** y **cro**, y la del origen que contiene a los genes iniciadores O y P y a los sitios de iniciación (**ori** y **ice**) para la replicación (Matsubara, 1981). La replicación se inicia cuando la transcripción que se origina en **pR** "activa" el origen y produce los iniciadores. El mismo transcrito produce un autorepresor (Cro) que inhibe la transcripción de **pRoR**, cuando su concentración es alta. Cuando la masa celular se incrementa, el nivel del autorepresor se reduce y la transcripción (y por consiguiente, la replicación) procede hasta que el nivel del autorepresor alcanza otra vez el umbral (fig. 6). Así este sistema permite que la replicación del plásmido este coordinada con el incremento de la masa celular (para una revisión, ver Matsubara, 1981). Mutaciones que aumentan la fuerza de **pRoR** (operador constitutivo), incrementan el número de copias del plásmido, el nivel del autorepresor Cro que este produce y la incompatibilidad con otros  $\lambda$ dv y fagos (Murotsu y Matsubara, 1980). 2 plásmidos  $\lambda$ dv son incompatibles si presentan la misma región de inmunidad (r. del autorepresor), mientras que son compatibles si



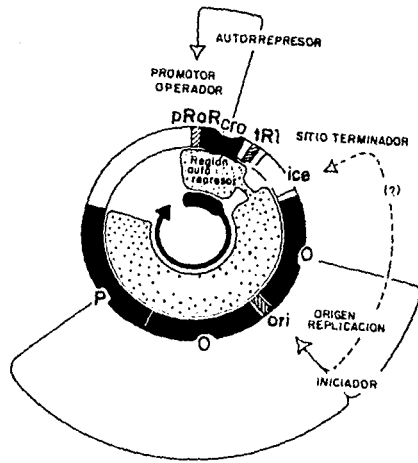
estas regiones son diferentes, aunque los plásmidos  $\lambda$ dv e imm434dv, que se encuentran muy relacionados, se comportan de una forma intermedia (Matsubara y Otsuji, 1978).

Entre los genes cro y cII, se localiza el terminador de la transcripción tR1 (dependiente de Rho). En ausencia de la proteína antiterminadora N, solamente el 50 % de la transcripción termina en este sitio (Court et al, 1980). Bajo estas condiciones, los niveles de expresión de los genes a la derecha de tR1 se encuentran reducidos con respecto a cro. De esta forma, el papel de tR1 podría ser el ajustar los niveles relativos entre Cro y CII para favorecer la Lisis ó la lisogenia, ó entre Cro (autorepresor) y la región del origen para controlar los eventos de inicio de la replicación.

La mutación cin1 que se encuentra en la región tR1 provoca un doble efecto: incrementa la eficiencia de terminación en tR1 (al 90 %) y crea un nuevo promotor para cI independiente de CII denominado pcin, que funciona constitutivamente (Rosenberg et al, 1978; Gussin et al, 1980). Los fagos que llevan la mutación cin1, no pueden propagarse en cepas himA- ó hip- (IHF-). Se ha propuesto que esta inhibición ocurre por una sobreproducción de CI a partir de pcin. En una cepa silvestre, IHF reprime a pcin por unión al sitio IHF que se traslapa con la región -35 de este (Griffo et al, 1989). La función "normal" que IHF lleva acabo sobre este sitio no ha podido ser determinada con claridad.

La proteína IHF de *E. coli*, participa en diversos procesos, tales como la recombinación sitio-específica del fago lambda, transposición, inversión, empaquetamiento del DNA de fagos,





**Fig. 6. Los circuitos regulatorios y la representación esquemática del genoma de *dv*.** Como se puede observar el genoma de *dv* consiste de una región del autorepresor y una región del origen conectadas una con otra. Una flecha circular dibujada en el interior del genoma representa la transcripción que comienza en *pRoR*.

transferencia de plásmidos, replicación del DNA de plásmidos y fagos, y en el control positivo y negativo de la expresión genética (para una revisión ver Friedman, 1988). IHF es un heterodímero, cuyas subunidades alfa y beta son codificadas por los genes himA y hip respectivamente. Aunque el mecanismo de acción de IHF no se conoce totalmente, se sabe que flexiona ó curva el DNA, cuando esta se une a su secuencia de reconocimiento (consenso) sobre el canal menor de la doble hélice (Mengeritsky et al, 1993); estos cambios conformacionales pueden tener efectos positivos ó negativos dependiendo del contexto de los componentes implicados (Claverie-Martin y Magasanik, 1992). IHF regula la actividad transcripcional de varios promotores del fago lambda; estimula el inicio de la transcripción de pL, aunque el sitio de unión de IHF se encuentre fuera del promotor (Giladi et al, 1990); y reprime la actividad de los promotores pR' y pcin. En ambos casos la secuencia de unión de IHF se traslapa con la región -35 de estos (Kur et al, 1990; Griffo et al, 1989).

## OBJETIVOS

Aislamiento y caracterización de mutantes del bacteriófago lambda con un fenotipo similar a las mutantes sib.

El propósito inicial era obtener mutaciones en el sitio sib; sin embargo las mutantes opc aisladas, además de mostrar un fenotipo similar a las mutantes sib, revirtieron el efecto de la mutación cin1 en cepas IHF- (formando placas turbias). Estos hechos sugerían que las opc eran un tipo de mutación(es) diferente(s) a sib y puesto que sus efectos resultaron interesantes, se decidió caracterizarlas. El estudio de las mutantes opc, podría ayudar a entender la regulación de la integración y en un contexto más amplio el control de la lisogenia del fago lambda.

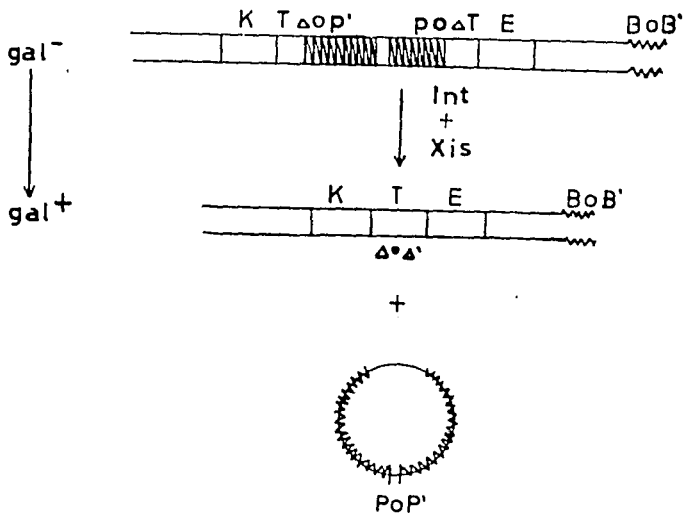
## ESTRATEGIA

La estrategia que se utilizó para la selección de las mutantes fué el ensayo denominado "ensayo de placa roja" desarrollado por Enquist y Weisberg (1976). Este ensayo se basa en la escisión de un profago críptico que se encuentra insertado en el gene galT; por lo que la bacteria, que en principio tenía un fenotipo Gal- adquirirá un fenotipo Gal+ (ver fig. 7). Dado que la reacción de escisión depende de las proteínas Int y Xis proporcionadas por un fago infectante, se puede esperar que fagos que produzcan distintos niveles de las proteínas, como es el caso de los fagos sib+ y sib- muestren un fenotipo diferente. Así las placas formadas por los fagos sib- serían rojas en un tiempo de incubación menor que la de los fagos sib+, debido a la mayor expresión de Int (fenotipo Sib-). Existen evidencias que sugieren que sib no tiene efecto (ó este es muy discreto) sobre la expresión de xis, el gene adyacente a int (ver fig. 4) y cuyo producto también se requiere para la reacción de escisión (Schindler y Echols, 1981; Ortega, 1983).

Los fagos que se utilizaron en el ensayo de placa roja se diseñaron con las siguientes mutaciones ó marcadores genéticos: HindIIIred114cI857cinlcII68 (sib+ ó sib-).

La mutación cII68 (CII defectiva) se utilizó para evitar la expresión de int a partir de pI, para que la expresión de int sólo estuviera dada a partir de pL, que es la condición para el estudio de sib (Guarneros y Galindo, 1979); pero debido a que CII también regula positivamente la expresión de ci (gene del represor)

fué necesario utilizar la mutación cin1 que crea un promotor para cI independiente de la regulación de CII (Wulff, 1976); de esta forma se obtuvo represión en condiciones cII-. la mutación red114 redujo la posibilidad de que la escisión del profago en el ensayo se diera por un mecanismo distinto al sitio-específico. La delección HindIII, que elimina el 8% del DNA del fago (esta región, deja un espacio de 250 pb entre ésta y el sitio de inserción att, donde se localiza sib) se utilizó con el fin de que el mapeo genético de posibles mutaciones en esa región fuera más fácil.



**Fig. 7. El ensayo de placa roja.** Una cepa de *E. coli* (de placa roja) con un profago críptico en el gene *T* del operón *gal* le confiere un fenotipo Gal<sup>-</sup> (mutación por inserción). Si a esta bacteria se le infecta con fagos que puedan proporcionar las funciones *Int* y *Xis* (proteínas indispensables para la escisión sitio-específica del fago) el profago críptico se escinde del genoma bacteriano, dejando un operón Gal<sup>+</sup> funcional. Si además el fago infectante reprime sus funciones líticas para la obtención de lisógenas, la reversion de *gal*<sup>-</sup> puede ser detectada por formación de placas rojas (en un medio indicador que reacciona al cambio de pH, por utilización de galactosa).

## MATERIAL Y METODOS

**Bacterias:** las cepas bacterianas y su genotipo relevante se enlistan en la tabla A.

**Bacteriófagos:** Las mutaciones fágicas utilizadas en diferentes combinaciones se dan en la tabla B.

### MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS:

**TØ** (bacto triptona, 10 g; NaCl, 2.5 g; 2 ml de NaOH al 2%; agar 10 g; se aforó a 1000 ml de H<sub>2</sub>O); **TØ suave** (idéntico a TØ, excepto que se agregó 6 g/l de agar); **LB** (Luria: triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g; NaOH al 2%, 4.8 ml; se aforó a 1000ml de H<sub>2</sub>O. En caso de la preparación de cajas se agregaron 15 g de agar); **Tet-C** (triptona, 10 g; NaCl, 5 g; agar, 11 g; se esterilizó y añadió 2.5 ml de cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolium (TTC) al 1%; 50 ml de D-galactosa al 20%; se aforó a 1000 ml de H<sub>2</sub>O); **EMBO** (agar EMB, 27.5 g; se aforó a 1000 ml de H<sub>2</sub>O); **TB** (triptona, 10 g; NaCl, 5 g; se aforó a 1000 ml de H<sub>2</sub>O); **TB-D** (TB + 0.2% de maltosa); **SM** (NaCl, 5.85 g; gelatina, 0.5 g; H<sub>2</sub>O, 480.5 ml; se ajustó el pH a 7.4 con 0.2 ml de HCl 1N; se esterilizó y agregó 5 ml de Tris 1M pH 7.4; MgSO<sub>4</sub> 1M 2.5 ml); **M56** (fosfato di-ácido de potasio, 13.6 g; sulfato de amonio, 2 g; sulfato de magnesio, 0.2 g; sulfato ferroso, 0.5 mg; glicerol, 2 g; se ajustó el pH a 7 y se aforó a 500 ml de H<sub>2</sub>O. Para la preparación de cajas se agregaron 6 g de agar, 50 ug/ml de ampicilina, galactosa a una concentración final

de 0.2%, vitamina B1 a una concentración final de 1% y L-histidina a una concentración final de 2% ó también se utilizó la siguiente fórmula para el medio mínimo (sales 1X): (fosfato de fosfato monobásico 6.8 g, sulfato de amonio, 1 g; sulfato de magnesio, 0.1 g; cloruro de calcio, 5 mg; sulfato ferroso, 2.5 mg; se ajustó el pH a 7.4 y aforó a un litro de H<sub>2</sub>O); **medio mínimo suplementado** (1X de sales M56; casaminoácidos, 2%; extracto de levadura, 0.006%; fructosa, 2%; L-histidina, 0.005% y vitamina B1, 0.0001%; ampicilina, 50 ug/ml; concentraciones finales); **solución M1 (mix 1)** (NaF, 16 mM; DTT, 5mM; concentraciones finales); **solución M2 (mix 2)** (MgCl<sub>2</sub>, 8 mM; ATP, 3.2 mM; Tris HCl, 200 mM pH 7.9: concentraciones finales); **solución M3 (mix 3 ó solución de lisis)** (EDTA, 100 mM; DTT, 100 mM; Tris HCl, 50 mM pH 8; concentraciones finales); **solución de galactosa 14C** (50 ul de una solución de galactosa 14C {Amersham 4.5 X 10<sup>exp6</sup> dpm/uM}, 950 ul de una solución de galactosa 20 mM); **solución amortiguadora TBE** (Tris HCl, 0.089 M; ácido bórico y EDTA, 0.002; concentraciones finales); **solución I** (glucosa, 50 mM; EDTA, 10 mM; Tris HCl, 25 mM pH 8 y 5 mg/ml de lisozima; concentraciones finales); **solución II** (NaOH, 0.2 M y SDS, 1%; concentraciones finales); **solución III** (acetato de sodio, 3 M pH 4.8). En todos los medios preparados se utilizó H<sub>2</sub>O destilada y la esterilización se efectuó en autoclave por 20 min a 121 C, 15 p.s.i..

**Condiciones de plaqueo.** Alicuotas de una suspensión de fagos (en SM) se mezclaron con 0.1 ml de un cultivo bacteriano (crecido por



toda la noche a 32°C) y se dejó adsorber de 10-20 min a temperatura ambiente. Se añadieron de 2.0 a 2.5 ml de TO suave fundido y el contenido se distribuyó en una placa de agar (ó el medio que se indique).

**Propagación de fagos por infección:** En un matraz Erlenmeyer de 125 ml se colocaron 5 ml de LB, 0.5 ml de la bacteria adecuada (generalmente Q1) que había sido crecida toda la noche en TB-D, 50  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 1M, y una placa lítica del fago por propagar. Se incubó a 39°C hasta obtener lisis (de 3 a 5 hrs., en agitación); se agregó aproximadamente 10 gotas de cloroformo y se agitó por 15 min. Se centrifugó para eliminar los restos celulares a 10 Krpm por 10 minutos en el rotor Sorvall SS34. El sobrenadante se tituló en la bacteria adecuada (utilizando diluciones en SM 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>). En general se obtienen titulos de un rango de 10<sup>9</sup> a 10<sup>10</sup> fagos por ml (dependiendo del genotipo fágico).

**Método para la construcción de fagos recombinantes:** Se creció la cepa adecuada hasta una A<sub>590</sub>=1 en TB-D (4 x 10<sup>8</sup> cel/ml). En un tubo se colocaron 10<sup>6</sup> ufp de cada fago progenitor en la cruza (ó la mdi deseada); se agregó 0.1 ml del cultivo bacteriano. Se adicionó MgSO<sub>4</sub> para dar una concentración final de 0.01 M, y se llevó a un volumen constante con TB (no mayor de 0.5 ml). Se permitió la adsorción durante 20 min a temperatura ambiente, después de la cuál se le agregó 5ml de TB y se incubó en agitación por 90 min a 37°C. Se le agregaron a la mezcla unas gotas de cloroformo y se agitó por

15 min. se tituló el lisado obtenido sobre la bacteria indicadora adecuada.

**Complementación por estria para lisogenia:** Se prepararon suspensiones de  $1 \times 10^7$  fagos/ml. Alicuotas de 20  $\mu$ l de uno de los fagos se esparcieron a lo largo de un tapiz bacteriano en una placa de agar para formar una estria; después de haberse secado ligeramente la estria de la suspensión de fago, una alícuota de 10  $\mu$ l del fago a complementar se esparció en ángulo recto a la estria anterior. las cajas se incubaron a la temperatura adecuada.

**Ensayo de placa roja:** Se mezcló 0.1 ml de un cultivo bacteriano crecido a 32°C toda la noche, de las cepas de placa roja (137 ó K713, que llevan insertado un profago criptico en galT) con una suspensión conteniendo de 100 a 1000 ufp de los fagos a examinar. Se permitió la adsorción por 15 min, agregandose después 2.5 ml de TO suave y se vació a placas de gal-TTC (Tet-C). Después de que las placas se secaron, se incubaron a 34°C por 18-24 hrs. Alternativamente, en un tapiz bacteriano (con las cepas mencionadas anteriormente sobre las placas de Tet-C) se estriaron suspensiones de los fagos a examinar con un palillo estéril (ver Enquist y Weinberg, 1976).

**Mutagénesis.** Se utilizó la cepa que contiene el alelo mutador mutD5 (Fowler et al, 1974) que promueve mutaciones por crecimiento del fago en esta cepa. La mutagénesis del fago

HindIIIred114cI857cin1cII68 se realizó por una modificación del método de Enquist y Weisberg (1976). Se creció la cepa mutD5 en LB toda la noche. Al día siguiente se tomó 0.1 ml de este cultivo y se mezcló con una concentración de suspensión de fagos adecuada para obtener placas aisladas. La mezcla se plaqueó en TØ (ver condiciones de plaqueo). Aproximadamente se obtuvieron el 1% de placas claras. Se tomaron 100 placas turbias aisladas y se resuspendieron en 1 ml de SM y se probaron por el método de selección de placa roja. Posteriormente se tomaron las placas que se comportaban como Sib- y se purificaron 2 veces por estría en la cepa de placa roja con los controles respectivos. Al final se eligieron 21 candidatos de placas diferentes. La mutagénesis con mutD5 genera transiciones, transversiones y en menor frecuencia adición de bases.

**Cruzas líticas (PP' x BB')**: La recombinación sitio-específica se llevó a cabo por la técnica descrita por Guarneros y Echols (1970): La cepa S601recA-, que se creció a una  $A_{690} = 1$  ( $4 \times 10^8$  cel/ml). Se tomaron 0.1 ml de este cultivo y se infectó con  $4 \times 10^8$  de cada fago progenitor en la cruza. Se adicionó MgSO<sub>4</sub> a una concentración final de 0.01 M en un volumen total de 0.5 ml (se ajustó con TB). Después de 15 min de adsorción a temperatura ambiente, las células infectadas se diluyeron 1:100 en TB-D precalentado a 37°C y se agitaron por 90 min a 37°C. Se terminó la lisis por adición de 5 gotas de cloroformo. los fagos recombinantes se identificaron y aislaron por plaqueo en la cepa 198recA-gal- de las diluciones 10<sup>11</sup>,

$10^{-4}$  y  $10^{-5}$  en cajas Tet-C (donde sólo crecen el fago progenitor PP' y el fago recombinante BP', que forma placas rojas porque es transductor de gal) y en la cepa S165(P2)gal- (donde sólo plaquean el fago progenitor BB' que da placas rojas por gal y el fago recombinante BP' que da placas blancas).

**Ensayo de superinfección:** Este ensayo, diseñado por Guarneros y Galindo (1979) mide la actividad de la integrasa por escisión de un profago con los sitios PP' y BB'. La cepa SA731(int2red114cI857cII41gal8) se creció en TB-D toda la noche a 32°C. Una alícuota del cultivo nocturno se diluyó 1:50 en TB-D y se creció a 32°C hasta una  $A_{590}=1$  ( $4 \times 10^8$  cel/ml). En tubos eppendorff (de 1.5 ml) se prepararon las mezclas de adsorción, agregando el fago auxiliar a una mdi de 10 y MgSO<sub>4</sub> hasta una concentración final de 0.01 M. Las mezclas de adsorción se llevaron a un volumen constante con TB. Se les adicionó 0.1 ml del cultivo a  $A_{590}=1$ , y se permitió la adsorción por 3 min a temperatura ambiente y 17 min a 0°C (hielo-agua). Las células infectadas se diluyeron en 1 ml de TB frío y se centrifugó por 4 min (el sobrenadante se puede guardar para calcular el % de adsorción titulando en una cepa Su3gal-(imm434). La pastilla se resuspendió en 0.5 ml de TB-D frío y se pasó a un matraz Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 4 ml de TB-D frío. El tubo se lavó con 0.5 ml con 0.5 ml de TB y se pasó al matraz. Se tomó una alícuota de 0.1 ml para medir centros infectivos. Estos se calcularon restando las placas resistentes a cloroformo (Ø libre, dilución  $10^{-3}$ ) del total de las unidades

formadoras de placas (pt, dilución  $10^{-4}$ ) en la cepa Su3gal-(imm434). El matraz se incubó en agitación a 39°C por 85 min. Se adicionaron 5 gotas de CHCL<sub>3</sub> para completar la lisis celular. Se tituló de las diluciones  $10^0$  a  $10^{-3}$  en Tet-C en la cepa Su3gal-(immcI) donde las placas rojas (fago transductor de gal) representan el fago escindido por Int y las placas blancas son gal-. También se plaqueó la dilución  $10^{-4}$  en la cepa Su3(imm434) para determinar la tasa de eclosión del fago auxiliar (en T $\emptyset$ ). El número de fagos gal+, gal- y del auxiliar (todos en 5 ml) se dividió entre el número de centros infectivos (en 5 ml) para obtener el número de cada tipo de fago por célula infectada. El fago gal+ representa profagos escindidos por recombinación integrativa, y refleja la actividad de la integrasa (índice de integración). Dado que los otros 2 valores permanecen constantes, en las tablas sólo se da el índice de integración.

**Frecuencia de lisogenia:** Las células (normalmente S165) se crecieron a una  $A_{590} = 1$  y 0.1 ml de este cultivo se infectó con una mdi de 10 de los fagos a examinar con una concentración final de 0.01 M de MgSO<sub>4</sub> y todos los tubos se llevaron a un volumen constante. Se permitió la adsorción por 30 min a temperatura ambiente y después se centrifugó por 4 min en la microfuga Eppendorff. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de TB-D. Se tomó una alícuota para calcular centros infectivos (ver superinfección) en S165. Se incubó a 32°C (para fagos gI857) por 90 min (incluyendo un control sin infectar. Se

espatularon diluciones para obtener colonias bacterianas aisladas ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) en cajas LB ó EMBO. Se probaron 100 colonias por estria para inmunidad con fagos cI- e imm434cI- (para obtener el número de lisógenas y de resistentes). A las células cI-resistentes, se les resta el número de células imm434-resistentes y este número se divide entre los centros infectivos para obtener la frecuencia de lisogenia.

**Tasa de eclosión:** Se creció la bacteria adecuada en TB-D a 32°C hasta una concentración de  $4 \times 10^8$  cel/ml ( $A_{550} = 1$ ). Se adicionó a 0.1 ml del cultivo  $4 \times 10^8$  fagos y  $MgSO_4$  a una concentración final de 0.01 M. Se permitió la adsorción por 3 min a temperatura ambiente y por 17 min en frío (hielo-agua), se llevó a un volumen de 1 ml y se centrifugó por 4 min en la microfuga Eppendorff. La pastilla fué resuspendida en 1 ml de TB-D y se diluyó en 5 ml de TB-D. Se tomó una alícuota para calcular centros infectivos (ver superinfección) en S165. El resto del cultivo se incubó en agitación a 39°C durante el tiempo indicado en cada experimento, al final se agregó cloroformo para completar la lisis celular y se tituló en S165 ó Q1. Los valores se dan como tasa de eclosión por centro infectivo.

**Obtención de lisados concentrados del bacteriófago lambda:** Se mezclaron 20 ml de un cultivo bacteriano crecido toda la noche con 0.05 ml de una suspensión de fagos con una concentración aproximada de  $10^{14}$  fagos por ml y se incubaron por 5 min a 32°C. Se añadió 980

ml de medio Luria con 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y se agitó vigorosamente de 5 a 8 hrs a 39°C (no es recomendable dejar más tiempo). Después de la lisis, se añadió NaCl a una concentración final de 0.5 M y 0.2 ml de cloroformo después de que la sal se disolvió. Posteriormente se clarificó el lisado por centrifugación a 4000 rpm por 15 min en el rotor GSA. Al sobrenadante (lisado) se le adicionó PEG (polietilenglicol) al 10% W:V y se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvió; posteriormente se incubó a 4°C cerca de 1 hr para precipitar las partículas fágicas. Se colectó la pastilla de PEG por centrifugación en el rotor GSA a 6000 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla se redisolvió en 5-10 ml de SM. El PEG se extrajo con un volumen igual de CHCl<sub>3</sub>, agitando por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min para recoger la fase acuosa superior, que es la que contiene los fagos concentrados.

**Extracción del DNA del bacteriófago lambda:** Después de concentrar los fagos en un gradiente de cloruro de cesio; se dializó con una solución de NaCl, 10 mM; Tris HCl, 50mM pH 8 y MgCl<sub>2</sub>, 10 mM con un volumen de 1000 veces el volumen del gradiente por 1 hr, después se cambió la solución de diálisis y se dejó por 1 hr. Se transfirió la suspensión de fagos a un tubo, ocupando la 1/3 parte del volumen, se adicionó EDTA a una concentración final de 20 mM, proteínas: K a una concentración final de 50 ug/ml, y SDS a una concentración final de 0.5%, invirtiendo el tubo varias veces después de añadir cada reactivo; se incubó a 65°C por 1 hr. Posteriormente se procedió a extraer las proteínas con fenol equilibrado invirtiendo

el tubo varias veces, y se separaron las fases por centrifugación a 1600 g por 5 min a temperatura ambiente, entonces la fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo limpio y se extrajo con un volumen de una mezcla de fenol/cloroformo (1:1); se recuperó la fase acuosa como en el paso anterior y se extrajo con un volumen de cloroformo y se volvió a recuperar la fase acuosa de la misma forma. La solución, que lleva el DNA se colocó en una bolsa de diálisis y se dializó con 1000 su volumen con TE a 4°C por 12 hr, efectuando 3 cambios de TE. El DNA se precipitó añadiendo acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M y 2 volúmenes de etanol y colocando el tubo en un baño de hielo seco/etanol por 5 min. Se centrifugó en una microfuga por 5 min y se eliminó el sobrenadante con mucho cuidado. La pastilla se lavó con etanol al 70% frío 2 veces y se secó en un speed-vac. la pastilla de DNA se resuspendió en TE.

**Aislamiento de DNA plasmídico:** Las bacterias portadoras del plásmido se crecieron en 5 ml de medio LB-ampicilina durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se centrifugaron a 10 Krpm durante 10 minutos en el rotor SS34 Sorvall, se desechó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 200 ul de la solución I. Las mezclas se incubaron en hielo durante 5 minutos, añadiéndose enseguida 400 ul de la solución II, mezclándose suavemente por inversión. Después de mezclar los tubos se dejaron reposar por 5 minutos en hielo y se adicionaron 300 ul de la solución III, mezclándose las preparaciones suavemente. Las mezclas se colocaron



en un baño de hielo seco-etanol durante 5 minutos descongelándose a temperatura ambiente, enseguida se mezclaron 750 ul con 1 volumen de isopropanol para precipitar el DNA a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las preparaciones se centrifugaron a temperatura ambiente (12 Krpm) por 15 minutos en una microfuga Eppendorff, lavándose la pastilla resultante dos veces con etanol al 70%. Las pastillas se resuspendieron en 50 ul de agua bidestilada estéril. Cuando fué necesario se precipitó el DNA una segunda vez, empleando 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5 M y dos volúmenes de etanol absoluto.

**Preparación de células competentes:** Cultivos bacterianos crecidos durante toda la noche (a 32 ó 37°C) se diluyeron cien veces en medio LB, incubándose nuevamente a la misma temperatura hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.4-0.6 a 600 nm. Las células se centrifugaron en frío a 6 Krpm durante 10 minutos en el rotor SS34 Sorvall, resuspendiéndose en medio volumen de CaCl<sub>2</sub> 100 mM (con respecto al volumen inicial), permaneciendo las muestras en frío por un mínimo de 12 hr antes de utilizarse.

**Transformación de Escherichia coli con DNA plasmídico:** A cada 200 ul de células competentes se les adicionó de 50 a 100 ng de DNA. Las muestras se colocaron 30 minutos en hielo y 2 minutos a 42°C (cuando las cepas eran lisógenas este paso se efectuó a 32°C), se diluyó 1:10 en medio LB precalentado y se incubó por 1 hr a 37°C (ó a 32°C para las lisógenas); se espatularon 100 y 200 ul en cajas

de LB-ampicilina (50 ug/ul).

**Corte de DNA plasmídico con enzimas de restricci3n:** El DNA de los plásmidos se cortó con las enzimas indicadas, utilizando la soluci3n reguladora y temperatura de reacci3n recomendadas por el proveedor de las enzimas (New England Biolabs ó BRL).

**Cuantificaci3n de unidades de galactocinasa:** Estos ensayos se efectuaron de acuerdo al procedimiento de McKenny et al (1981). Cultivos bacterianos de la cepa SA1943 (transformada con cada uno de los plásmidos de interés), se crecieron durante toda la noche en medio M56. Al día siguiente se diluyó el cultivo 20 veces en medio M56 suplementado con fructosa 0.2%. Las muestras se incubaron con agitaci3n a 37°C hasta una  $A_{650} = 0.4-0.6$ . Un mililitro del cultivo anterior se mezcló con 40 ul de la soluci3n M3 (Mix 3), agregándose tres gotas de tolueno antes de agitar con el vortex durante 30 segundos. Los lisados resultantes se incubaron con agitaci3n a 37°C hasta que se evaporó el tolueno; las mezclas se colocaron en hielo; para iniciar la reacci3n, se adicionó 20 ul del lisado a una mezcla de 20 ul de la soluci3n M1 (mix 1), 50 ul de la soluci3n M2 y 10 ul de la soluci3n de galactosa C-14. Las reacciones se agitaron suavemente, incubándose por 20 minutos a 32°C (por duplicado) y para detener la reacci3n se pipetearon 25 ul sobre un filtro DE-81. Para la cuantificaci3n de las reacciones, los filtros se lavaron cada uno 10 veces con agua destilada, utilizando vació. Una vez que se secaron los filtros se cuantificó su contenido de

radioactividad, utilizando un contador de centelleo. Las cuentas totales se determinaron agregando 25 ul de una mezcla de reacción (tomada al azar) a un filtro DE-81 (por duplicado) y cuantificando su contenido de radioactividad sin ser sometido a los lavados. Las unidades de galactocinasa se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$U \text{ gal K} = \frac{(\text{cpm problema} - \text{cpm blanco}) (5200)}{(\text{cpm totales}) (\text{D.O.}) (\text{tiempo})} \times 5$$

#### **Extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa:**

A) Los fragmentos de DNA de interés se sometieron a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.7%. Se identificaron y cortaron los fragmentos de interés mediante la visualización del DNA (teñido con bromuro de etidio) en un transiluminador de luz U.V. (longitud de onda larga). Las porciones de los geles que contenían a los fragmentos de DNA se calentaron a 65°C hasta fundirse la agarosa (10-20 minutos). Se ajustaron las muestras a 0.3 M de cloruro de sodio, agregándose un volumen de fenol saturado (calentado a 65°C), las mezclas se agitaron en vortex, congelándose posteriormente las preparaciones se centrifugaron en frío durante 15 minutos a 12 Krpm en una microfuga Eppendorff. A las fases acuosas resultantes se les aplicó una extracción fenólica, dos extracciones con fenol-cloroformo y una con cloroformo. El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y medio volumen de acetato de amonio 2.5 M y dos lavados

con etanol al 70%. La pastilla seca se resuspendió en agua bidestilada estéril.

B) Para agarosa normal: El fragmento de gel con la banda de DNA de interés, se maceró en un tubo Eppendorff, agregó 100 ul de fenol equilibrado, agitó en vortex y se centrifugó en una microfuga por 2 minutos. Con mucho cuidado se tomó la fase superior que se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, se dejó descongelar y se centrifugó por 15 minutos en frío. Se colectó el sobrenadante en frío y se reextrajo con fenol y 100 ul de TE; se agitó en vortex, congeló y se centrifugó como la vez anterior; el sobrenadante se extrajo primero con fenol/cloroformo y luego con cloroformo y se precipito con acetato de sodio 0.3 M (concentración final) y 2 volúmenes de etanol; la pastilla se lavó con etanol al 70%, se seco y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

NOMBRE O CLAVE	CARACTERISTICAS
Q1	<u>supE</u> , supresor de mutaciones ambar. Signer y Weil, 1968.
S601	<u>recA-</u> , <u>gal-</u> ; deficiente en recombinación generalizada. Este laboratorio.
LE289	<u>supF</u> , supresor de mutaciones ambar, lisógena para el fago críptico ( <u>int-F</u> ) en <u>galT</u> . Para el ensayo de placa roja. Enquist y Weisberg, 1976.
M72( <u>imm434</u> )	<u>supF</u> , supresor de mutaciones ambar, <u>gal-</u> y lisógena para un profago con inmunidad <u>imm434</u> . Guarneros y Galindo, 1979.
M72( <u>immCI</u> )	<u>supF</u> , supresor de mutaciones ambar, <u>gal-</u> y lisógena para un profago con inmunidad <u>immCI</u> . Guarneros y Galindo, 1979.
M72( <u>imm21</u> )	<u>supF</u> , supresor de mutaciones ambar, <u>gal-</u> y lisógena para un profago con inmunidad <u>imm21</u> . Guarneros y Galindo, 1979.
GG235(SA731)	Lisógena para el profago: <u>int2red114cI857cII41gal8</u> , <u>recA-</u> . Guarneros y Galindo, 1979.
LE30	Cepa con el gene mutador <u>mutD5</u> . Fowler <u>et al</u> , 1974.
GG198	<u>supF</u> , supresor de mutaciones ambar, <u>gal-</u> , <u>recA-</u> , <u>lac</u> . Este laboratorio

Tabla A. Cepas bacterianas utilizadas. Para más detalle, consultar referencias.

---

**NOMBRE O CLAVE****CARACTERISTICAS**

---

N2668	<u>ligts</u> , impide el crecimiento de fagos <u>red</u> -. Colección NIH.
S165	<u>sup</u> <sup>o</sup> . Colección NIH.
K5185	N99 <u>himA</u> _82:Tn10. Delección en el gene <u>himA</u> , que inhibe la recombinación integrativa. Miller, 1981.
K936	<u>himA42</u> , inhibe la recombinación integrativa Miller y Friedman, 1980.
K173	Derivada <u>himA42</u> , de LE289. Para el ensayo de placa roja. Miller <u>et al</u> , 1980.
<u>hip</u> -	Inhibe la recombinación integrativa y al igual que todas las cepas <u>himA</u> -, impide el crecimiento de fagos <u>cin</u> -. Colección NIH.

---

Tabla A. (continuación). Cepas bacterianas utilizadas.

MUTACION	CARACTERISTICAS
<u>cI857</u>	Represor termosensible de <u>cI</u> . Sussman y Jacob, 1962.
<u>cII68</u>	Mutación de sentido equivocado de <u>cII</u> . Kaiser, 1957.
<u>cII41</u>	Mutación ambar de <u>cII</u> y que es suprimible por <u>supF</u> . Belfort, 1975.
<u>bio11</u>	Sustitución del operón <u>bio</u> , que elimina los genes <u>int</u> , <u>xis</u> , <u>red</u> y <u>gam</u> . Manly <u>et al</u> , 1969.
<u>bio10</u>	Sustitución del operón <u>bio</u> , que elimina los genes comprendidos entre PP' y <u>cIII</u> . Signer <u>et al</u> , 1969.
<u>redB114</u>	Mutación en <u>redB</u> que altera la función de recombinación generalizada del fago. Shulman <u>et al</u> , 1970.
<u>sib1,2,3</u>	Mutaciones en <u>sib</u> que eliminan la retroinhibición de <u>int</u> . Montañez <u>et al</u> , 1986.
<u>opc1-21</u>	Mutación que en conjunto con <u>cin</u> - da fenotipo Sib- en placa roja y crecen en cepas <u>ihf</u> -. Este trabajo.
<u>cin1</u>	Mutación en <u>trI</u> que incrementa su función y crea un promotor para <u>cI</u> independiente de CII. McDermitt <u>et al</u> , 1976.

Tabla B. Mutaciones del fago lambda utilizadas. Para más detalles consultar referencias.

---

---

**MUTACION****CARACTERISTICAS**

---

---

<u>cncl</u>	Mutación que revierte el efecto de <u>cin1</u> Wulff, 1976.
<u>inth3</u>	Mutación que incrementa la actividad de Int, aún en <u>himA-</u> . Miller <u>et al</u> , 1980
<u>gal8</u>	Sustitución de la región b2 del fago por el operón <u>gal</u> de <u>E.coli</u> . Feiss <u>et al</u> , 1972.
<u>Qam29</u>	Mutación ambar en el gene de replicación <u>Q</u> . Campbell, 1961.
<u>imm434</u>	Híbrido que contiene la región de inmunidad del fago lambda de <u>imm434</u> ( <u>Q</u> L hasta <u>cro</u> ) y el resto de lambda. Kaiser y Jacob, 1957.
<u>imm21</u>	Híbrido que contiene la región de inmunidad del fago <u>imm21</u> ( <u>N</u> hasta <u>Q</u> II) y el resto de lambda. Liedke-Kulke y Kaiser, 1967.
HindIII (E,F)	Deleción de los fragmentos de DNA E y F producidos por la enzima de restricción HindIII. Colección NIH.
<u>b2</u>	Deleción del 12% de DNA en la región b del fago. Kellenberg <u>et al</u> , 1961.

---

Tabla B. (continuación). Mutaciones del fago lambda utilizadas.



## CONSTRUCCION DE PLASMIDOS

Plásmidos pOPC0, pOPC1, pOPC4, pOPC10 y pOPS3. El DNA de cada uno de los fagos opc+cin1, opc1cin1, opc4cin1, opc10cin1 y opc+cin+ se digirió simultáneamente con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. El fragmento de 1584 pb de cada uno de los casos anteriores, y que cubre desde pRoR hasta el origen de replicación (coordenadas 37584-39168) se purificó y se clonó en el vector pBR322 cortado con las enzimas HindIII y EcoRI. Los marcadores de los plásmidos construidos son los siguientes pOPC0: opc+cin1; pOPC1: opc1cin1; pOPC4: opc4cin1; pOPC10: opc10cin1; y pOPS3: opc+cin+. (ver figs. 8, 9, 10 Y 11).

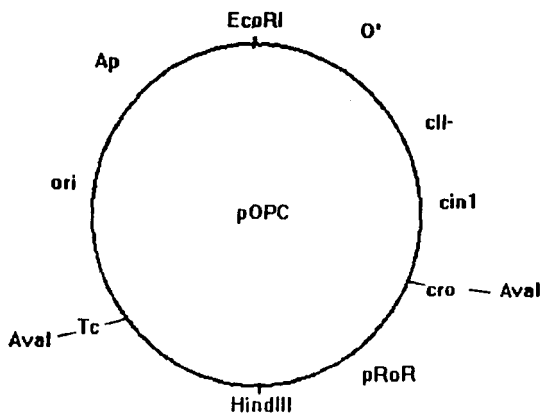
Plásmidos pOPC recombinantes de la región del autorepresor. Los plásmidos pOPC0, pOPC1 y pOPS3 fueron restringidos con la enzima AvaI; los fragmentos resultantes de 3892 y 2026 ('Tc-pRoR-cro') se purificaron por separado y el menor de cada uno se recombinó con los otros fragmentos mayores como se describe en el texto. Los plásmidos recombinantes con la orientación correcta se seleccionaron por resistencia a tetraciclina.

Plásmidos pAPC0 y pAPC1. Los plásmidos pOPC0 y pOPC1 fueron restringidos con la enzima AvaI. La banda de 3892 se purificó y se religó para dar lugar a los plásmidos pAPC0 y pAPC1, que perdieron la resistencia a tetraciclina, a pRoR y la mayor parte del gene cro que estaban contenidos en el fragmento de 2026 que fué eliminado.

pAPC0 se derivó de pOPC0 y pAPC1 de pOPC1 (ver fig. 12 y 13).

**Plásmidos pPRO y pPR1.** Los plásmidos pOPC0 y pOPC1 fueron restringidos simultáneamente con las enzimas HindIII y AvaI; se purificaron los fragmentos de 630 pb que contienen pRoR y parte del gene cro y se clonaron en el vector pK01 cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante con el fragmento derivado de pOPC0 se llama pPRO y el que tiene el fragmento derivado de pOPC1 se llama pPR1 (ver figs. 14 y 15).

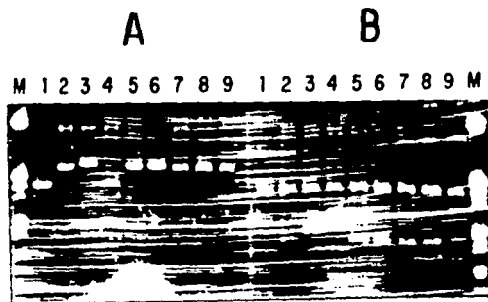
**Plásmidos p001, p002, pPP1, pOR1.** El plásmido pAPC0 se restringió parcialmente con las enzimas HindII y BglII. Los fragmentos BglII-HindII de 206 pb y 266 pb que contienen a oop, se clonaron en el vector pBR322 cortado con las enzimas EcoRV y BamHI para dar origen a los plásmidos p001 y p002 respectivamente. Los candidatos se seleccionaron por resistencia a ampicilina y sensibilidad a la tetraciclina. El fragmento HindII-HindII de 1074 pb que lleva a oop y el ori y a parte de pBR322 se clonó en el vector pBR322 cortado con HindII para dar lugar al plásmido pOR1. El fragmento HindII-HindII de 2816 pb que lleva parte del vector pBR322 y el ori, se ligó al fragmento HindII-BglII de 808 pb que lleva parte del vector pBR322, cin1 y ice; posteriormente se reparó y se ligó nuevamente para obtener candidatos resistentes a ampicilina para generar al plásmido pPP1 (figs. 16 y 17).



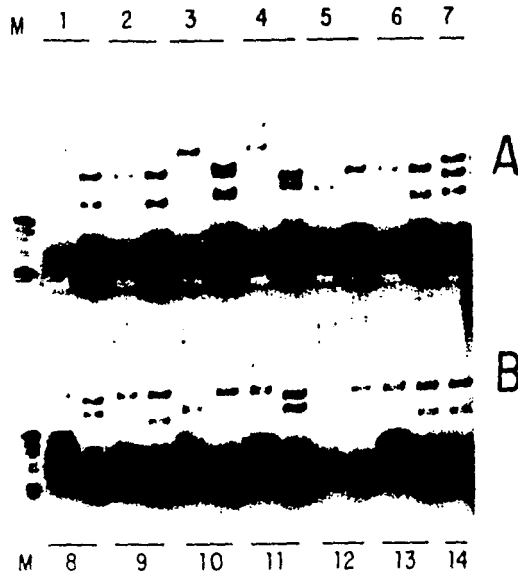
**Fig. 8. Plásmidos pOPC.** Estos plásmidos llevan el fragmento HindIII-EcoRI de 1584 pb que abarca desde pRoR hasta parte del gene O (que incluye el origen de replicación) del fago lambda. Los plásmidos relacionados que tienen la misma estructura, llevan como marcadores relevantes: pOPC0: opc+cin1; pOPC1: opc1cin1; pOPC4: opc4cin1; pOPC10: opc10cin1; y pOPS3: opc+cin+. En la figura se muestran los principales genes y sitios de restricción; el tamaño de todos los plásmidos es de 5918 pb.



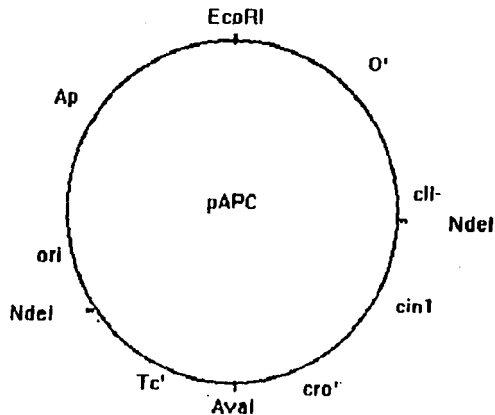
**Fig. 9. Patrón de restricción del DNA de lo fagos *opc cin*.** El DNA del vector y los fagos mencionados abajo, se digirieron con las enzimas HindIII y EcoRI, y sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%. Los DNAs digeridos fueron: pBR322 (carril 1), *opc1cin1* (carril 2), *opc+cin1* (carril 3) y *opc+cin+* (carril 4), la banda de 1584 pb (señalada con la flecha) de cada DNA fágico se purificó para su clonación. Observar que el patrón de restricción mostrado en los carriles 2 y 3 le faltan 3 bandas si se compara con el patrón del carril 4 (bandas de 2027, 1375 y 947 pb); esto se debe a que el DNA de dichos fagos lleva una deleción HindIII en la región b.



**Fig 10. Patrón de restricción de los plásmidos pOPC0 y pOPC1.** El DNA plasmídico de pBR322 y de 4 candidatos de cada plásmido se digirieron con la enzima HindIII (A) ó se sometieron a una doble digestión con las enzimas HindIII y EcoRI (B). Los carriles 2, 3, 4 y 5 muestran candidatos de pOPC0; mientras que los carriles 6, 7, 8 y 9 son candidatos de pOPC1; en el carril 1 se observa a pBR322 y en el carril M a DNA del fago lambda cortado con HindIII como marcador de peso molecular. El patrón de restricción del DNA de los candidatos que resultó conforme al esperado (carriles 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9), fué una banda de 5918pb con HindIII, y bandas de 4334pb y de 1584pb con HindIII/EcoRI.



**Fig. 11. Patrón de restricción de los plásmidos pOPC4 y pOPC10.** Los DNAs se digirieron con la enzima de restricción Aval. En (A) se muestran candidatos de pOPC4 (carriles 2 a 7) y como control a pOPC0 (carril 1); mientras que en (B) se muestran candidatos de pOPC10 (carriles 8 a 13) y como control a pOPC1 (carril 14). Todos los casos se dan por pares, a la izquierda se muestra el DNA sin restringir; mientras que a la derecha, el restringido con Aval (excepto e l carriles 7 y 14, en que sólo aparecen los DNAs restringidos). Las bandas esperadas después de la restricción son de 3892 y 2026pb y como se puede apreciar los candidatos de los carriles 2, 6, 9, 12 y 13 dan el mismo patrón que el de los controles. El DNA del fago  $\alpha$ X174 digerido con HaeIII se usó como marcador de peso molecular (M).

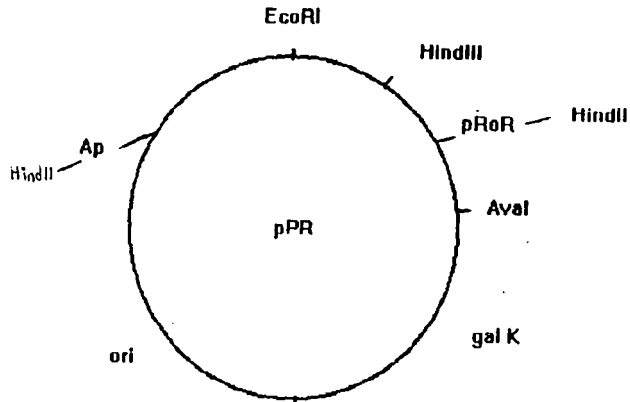


**Fig. 12. Plásmidos pAPC.** El plásmido pAPC0 se derivó del plásmido pOPC0; mientras que pAPC1 de pOPC1. Ambos plásmidos carecen del fragmento Aval-Aval de los plásmidos progenitores donde se encuentra la región del autorepresor (pRoR y cro); y conservan la región del origen, que incluye desde cin1 hasta parte de O. Si en la figura, se toman como punto de referencia los sitios de restricción Ndel, la parte inferior tiene 996 pb y la superior 2896 pb. El tamaño de los plásmidos es de 3892pb.

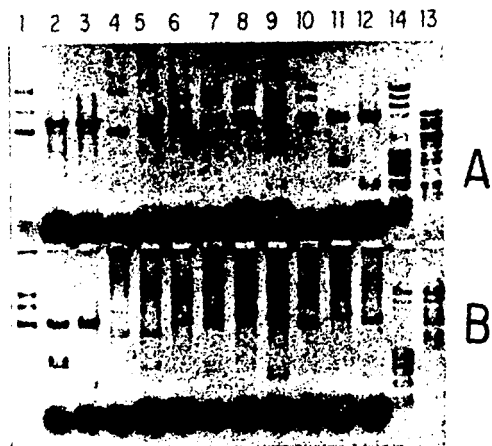


**Fig. 13. Patrón de restricción de los plásmidos pAPC0 y pAPC1.** El DNA plasmídico se digirió con la enzima NdeI. En los carriles nones se muestra el DNA sin digerir; mientras que en los carriles pares el DNA digerido. Los fragmentos esperados después del corte, son de 2896 y 996pb para dar el tamaño original de 3892 pb, tanto para pAPC0 (carril 4) como para pAPC1 (carril 8). Como control se utilizó pBR322 (carriles 1, 2, 5 y 6) que tiene un sitio de corte para NdeI y como marcador de peso molecular se usó el DNA del fago lambda digiendo con HindIII (M).

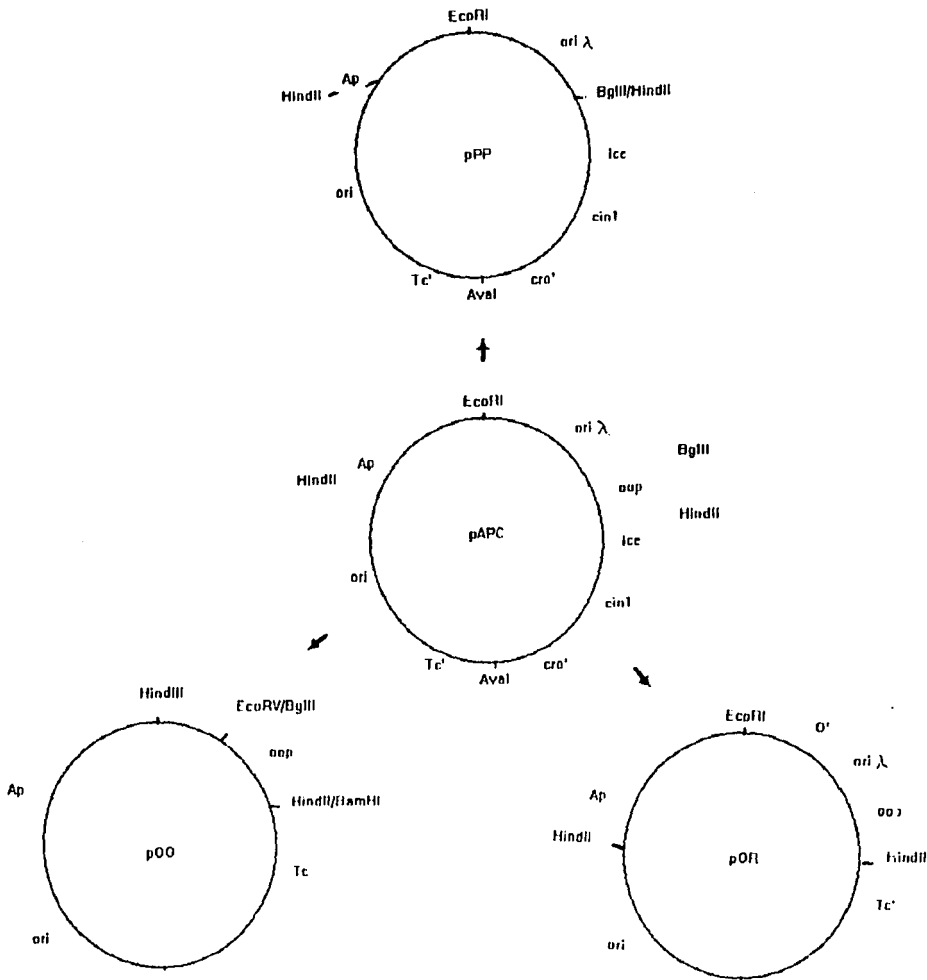




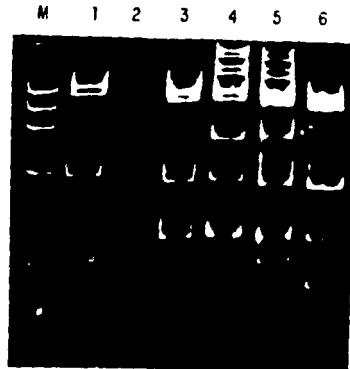
**Fig. 14. Plásmidos pPR.** El fragmento HindIII-Aval de 630 pb de los plásmidos pOPC0 y pOPC1 se clonaron en el vector pK01 para dar origen a los plásmidos pPR0 y pPR1 respectivamente. El fragmento clonado tiene el promotor pRoR y en esta construcción dirige la expresión de gal K. Si se toman como referencia los sitios de restricción HindII, la parte superior tiene 1152 pb y la inferior 3378 pb. El tamaño de los plásmidos es de 4530 pb.



**Fig. 15. Patrón de restricción de los plásmidos pPR0 y pPR1.** Los plásmidos se restringieron en un caso con la enzima HindII y en otro se hizo una doble digestión con HindIII y Aval. En (A) se muestran 3 candidatos de pPR0 (carriles 4 a 12) y como control el plásmido pK01 (carriles 1 a 3); mientras que en (B) se muestran 4 candidatos de pPR1 (carriles 1 a 12). A cada plásmido le corresponden 3 carriles, cuyo orden es 1o., DNA sin cortar; 2o., cortado con HindII y 3o., cortado con HindIII y Aval. Las bandas esperadas son de 3378 y 1152 pb con HindII y de 3900 y 630pb con HindIII/Aval para dar en ambos casos el tamaño de 4530 pb. Otro control utilizado fué el DNA del fago lambda cortado con HindIII y Aval (carril 13-A), y cortado con HindII (carril 1-B); como marcador de peso molecular se usó una mezcla del DNA del fago lambda cortado con HindIII<sup>1</sup> y el DNA del fago  $\phi$ X174 digerido con HaeIII (carril 14).



**Fig. 16. Plásmidos derivados de la región del origen.** A partir del plásmido pAPC0 que lleva la región del origen se subclonaron varios fragmentos de restricción para dar lugar a los plásmidos pOO1 y 2 (con el sitio oap), pOR1 (con los sitios oap y ori) y pPP1 (que es similar a pAPC0 pero sin el sitio oap). Ver texto para más detalle



**Fig. 17. Patrón de restricción del plásmido pOO2.** El DNA plasmidico se digirió con la enzima TaqI. Del carril 3 al 6 se muestra el patrón de 4 candidatos del plásmido pOO2; en el carril 1 el del vector pBR322 y en el 2. el de pAPC0. Los fragmentos esperados después del corte son, para pBR22: 1444, 1307, 475, 368, 315, 312, y 141pb; para pAPC0: 1444, 1332, 762, 196 y 166pb; para pOO2: 1444, 1307 475, 368, 272, 189, 166, y 141 pb . El patrón esperado de pOO2 se puede observar con claridad en el candidato del carril 6. Como marcador de peso molecular (M) se utilizó el DNA del fago  $\phi$ X174 digerido con HaeIII.

## RESULTADOS

### I. AISLAMIENTO DE MUTANTES CON FENOTIPO sib<sup>-</sup>.

Como se predijo inicialmente, al efectuar el ensayo de placa roja con fagos sib<sup>+</sup> y sib<sup>-</sup> se observaron diferencias apreciables entre ellos (tabla 1). A las 20 hrs de incubación se obtiene una diferencia marcada en el color de las placas; para los casos sib<sup>-</sup> se observan rojas, mientras que para el caso sib<sup>+</sup> se observan blancas y turbias (un fenotipo similar a los casos sib<sup>-</sup> se encontró para el fago b2<sup>-</sup>, datos no mostrados).

Es interesante remarcar que entre los fagos sib<sup>-</sup>, el caso sib3 se destacó por dar placas rojas con una intensidad de color mayor (son las primeras en que se visualiza un matiz rojo). La interpretación de este hecho no es clara, ya que en otros ensayos más sensibles que miden la actividad de Int no existen diferencias apreciables entre las mutaciones sib<sup>-</sup> (Montañez, 1986 ; Guarneros et al, 1982; Galindo J.M., com. per.; Estrada, B.).

Con el ensayo de placa roja como método de selección se aislaron 21 mutantes derivados de la mutagénesis por plaqueo en la cepa LE30 (MutD) del fago HindIII red114cI857cin1cII68 (para más detalle ver la sección de Material y Métodos). Todos los mutantes, denominados "opc" por "obstruir el promotor pcin" y por "operador constitutivo" (ver discusión) se comportan como el fago sib3 (tabla 1). Tanto en los casos sib<sup>-</sup> como en opc<sup>-</sup> se observa un

FAGO	FENOTIPO
sib+	BLANCO
sib1	ROJO +
sib2	ROJO +
sib3	ROJO ++
opc-	ROJO ++

Tabla 1. SELECCION DE MUTANTES opc- POR EL ENSAYO DE PLACA ROJA.- Se infectó la cepa LE289 con los fagos indicados. Todos los fagos llevan los marcadores HindIIIred114gI857cinIcII68. La incubación se realizó por 20 hrs a 34 C. Se probaron 21 candidatos opc- aislados independientemente. Las cruces denotan la intensidad de color de las placas rojas.

rango del 70-90% de placas rojas a las 24 hrs; a tiempos más prolongados de incubación el porcentaje se incrementa, pero las diferencias entre sib+ y sib- y opc- desaparecen.

## II. CARACTERIZACION DE FAGOS MUTANTES opc.

a) Fenotipo en IHF+ e IHF-.- Para determinar si los mutantes opc- habian sufrido algún cambio en los marcadores genéticos del bacteriófago original, se examinaron por plaqueo en diferentes cepas bacterianas indicadoras. Los resultados más relevantes se muestran en la tabla 2.

Se observó que los mutantes opc- a diferencia del progenitor opc+ (opc+cI857cin1cII68) plaqueó en cepas ihf- (himA- ó hip-). Una característica de fagos que portan la mutación cin1 es la de no formar placas en una cepa ihf- (Williams et al, 1977; Kikuchi et al, 1985) probablemente por sobreexpresión del represor CI a partir de pcin (ver Discusión y Griffó et al, 1989). Los resultados de la tabla sugieren pérdida de esta mutación (reversión) ó adquisición de otra mutación que sobrepase el efecto de cin- (pseudoreversión). Los mutantes opc- exhibieron un fenotipo turbio en las cepas ihf+ (Q1) y aún en la cepas ihf- (himA- ó hip-), resultado que indicaría síntesis de represor. Esta observación podría apoyar una pseudoreversión más que una reversión; y que además sería diferente a cnc1, la cual revierte los efectos de cin1. Otra posibilidad que parece menos probable es una doble reversión: de cin- a cin+ y de

	FAGO		Q1		himA- (ó hip-)	
	32 C	42 C	32 C	42 C	32 C	42 C
+	t	t	c	c		
cI857cII+	t	c	c	c		
cI857cII68	c	c	c	c		
cI857cinlcII+	t	c	-	c		
cI857cinlcII68	t	c	-	c		
sib3cI857cinlcII68	t	c	-	c		
cI857cinlcnc1cII68	c	c	c	c		
cI857cinlopc-cII68	t	c	t	c		
cI857inth3	t	c	t	c		

Tabla 2. Fenotipo de mutantes opc-.



**Tabla 2.- FENOTIPO DE MUTANTES opc-:** Las mutantes opc- junto con los fagos enlistados en la tabla se plaquearon en diferentes cepas bacterianas indicadoras para probar su genotipo. Se probaron en la cepa N2668 (en donde un fago red- no forma placas), en la cepa M72( $\lambda$ ) donde no forman placas, los fagos con la inmunidad del profago, en la cepa M72 (imm434); en la cepa Q1 donde los fagos son turbios a 32°C si son capaces de establecer represión y a 42°C donde los fagos cIts (857) son claros. En las cepas mencionadas anteriormente se obtuvieron los resultados esperados. También se probaron en las cepas himA- (K5185 y K936) y hip- donde los fagos cin- no forman placas. La letra (t) significa formación de placas turbias; la letra (c) significa formación de placas claras y el signo (-) implica que este fago no forma placas (aún a concentraciones de  $10^7$ ). En la tabla sólo se muestran aquellos resultados que podrían ser relevantes.

cII- a cII+. Un fago cII+ daría un fenotipo similar a sib- en el ensayo de placa roja y crecería en una cepa himA-, aunque formaría placas claras.

Con el fin de examinar la posibilidad de que los mutantes fueran cII+, se realizaron pruebas de complementación como las descritas en la tabla 3. Los resultados indican que las mutantes son cII- (línea 5) al igual que el progenitor opc+ (línea 4).

**b) Complementación en ihf- de fagos cin- y opc-.**- Para tratar de aclarar los efectos de la mutación cin1 en una bacteria himA- y su relación con la mutación opc-, se realizaron las pruebas de complementación presentadas en la columna de la derecha de la tabla 3. Se puede observar que el fago cin1cII68 no inhibe el crecimiento del fago cI857cII68 (a 32° y 42°C) indicando que el efecto de cin1 es en cis; por otra parte es incapaz de suplir en trans la función O para el plaqueo del fago imm21Oam29 que carece de ella, sugiriendo que posiblemente no expresa las funciones de replicación (el crecimiento que se observa a 42°C posiblemente se deba al fago cI857cin1cII68, ya que a esta temperatura no parece haber inhibición en himA-). El fago imm434cin1cII68 tampoco inhibe el crecimiento del fago cI857cII68 y tampoco complementa con el fago imm21Oam29 a ninguna de las 2 temperaturas. El hecho de que el efecto inhibitorio en himA- se observa a las 2 temperaturas para imm434cin1 podría sugerir algún papel para el represor ya que el fago cI857cin1 sólo muestra el efecto a baja temperatura donde el represor sí es funcional.

FAGO	himA+		himA-			
	cI+cII68		cI857cII68		imm21029	
	32	42	32	42	32	42
CI857	t	t				
cI857cII68	c	c				
cI857cin1	t	t				
cI857cin1cII68	t	c	+	+	-	-
cI857cin1cII68opc-	t	c	+	+	+	+
imm434cin1cII68			+	+	-	-

Tabla 3. Complementación para represor de fagos opc-.

**Tabla 3. Complementación para represor de fagos opc-:** Estas pruebas de complementación se efectuaron por el método de estría como se describe en la sección de material y métodos. La columna de la izquierda representa la complementación para represor en la cepa himA+ (S165). El fago cI+cII68 que por ser cII- es claro (c), pero cuando se coinfecta con un fago cI-cII+ ocurre complementación y aparece una región turbia en la intersección (t). Los resultados relevantes se dan a 42°C donde los fagos cI857cin1 que producen represor a 32°C no lo producen a 42°C; también se muestran los resultados a 32°C como control. En la tabla 2 se pueden observar los fenotipos a ambas temperaturas de los fagos por separado. En la columna derecha se da la complementación en la cepa himA- (K5185 y K936) para ver los efectos en cis ó trans de las diferentes mutaciones fágicas; (+) denota formación de placas y (-) ausencia de las mismas.

**c) Ensayo de placa roja en una cepa himA- de fagos opc-.-**

Miller et al (1980) aislaron la mutante del fago lambda inth, cuya integrasa tiene una actividad más eficiente de la normal y que además es activa en condiciones himA- (se aisló por formación de placa roja en una cepa himA-). Los fagos inth muestran un fenotipo similar al de opc- en himA- (ver tabla 4). Para establecer si existía una correlación de fenotipos entre inth y opc- se efectuó el ensayo de placa roja en una cepa himA-. Se encontró que las placas de los mutantes opc-, si bien son turbias son incapaces de generar un fenotipo rojo como inth (tabla 4), lo que demuestra que opc- es un tipo de mutación diferente.

**d) Actividad de integrasa.-** El fenotipo similar entre opc- y sib- (en placa roja) sugería un nivel de expresión mayor de int de los mutantes opc-. Con el propósito de probar y cuantificar la expresión de int de los mutantes opc- se realizó el ensayo de superinfección (Guarneros y Galindo, 1979).

De los resultados (tabla 5) se observa que aunque el índice de integración obtenido para los mutantes opc- está 3 órdenes de magnitud abajo del obtenido para el fago sib-, es muy similar al obtenido para el fago sib+cII-. Tal vez sea importante remarcar que el nivel de integración de los casos opc- fué 1 orden de magnitud arriba que el del caso opc+. Estos resultados indican que si bien los niveles de expresión de int de los fagos opc- no se encuentran tan elevados como el del fago sib-, sí son mayores que su progenitor (opc+cIn-cII-); por lo que tal vez en el fenotipo

FAGO	himA-	K713
sib+	-	-
sib3	-	-
opc-	t	t
inth3	t	R

Tabla 4. Ensayo de placa roja en una cepa himA- de fagos opc-.- El ensayo de placa roja se efectuó como se describe en la sección de material y métodos. Se utilizó la cepa K713, que es una cepa para el ensayo de placa roja y que tiene la mutación himA-; como control de plaqueo se muestra el fenotipo de los fagos en himA- (columna izquierda). La incubación se efectuó por 24 hrs a 34°C. Las letras y signos denotan el fenotipo de las placas: (-) no se obtienen placas; (t) placas turbias y blancas; (R) placas rojas. Los fagos sib+, sib3 y opc- también llevan las mutaciones ó marcadores HindIIIred114cI857cin1. Las mutaciones opc- utilizadas fueron opc1, 4 y 10.

Sib- de los fagos opc, no solamente esté involucrado el nivel de integrasa (ver discusión). Probablemente exista una relación de este fenotipo y el observado en las cepas ihf-, además estos resultados descartan la posibilidad de que los fagos opc- sean cII+ (que se comportan igual que sib-).

**e) Frecuencia de lisogenia.-** Los fagos con mutaciones opc- compensan el efecto "letal" de la mutación cin1 en bacterias ihf- y además exhiben un fenotipo turbio (en himA-, hip-, Q1, ó S165). Para determinar si la mutación opc- afectaba la eficiencia de lisogenia, se estimó la frecuencia de lisogenia (tabla 6).

Los resultados muestran que los mutantes opc- son aproximadamente un tercio ó un medio de eficientes en lisogenización comparadas con el caso opc+. Estos resultados podrían indicar un nivel ligeramente menor de represor, y consecuentemente podrían tener un nivel mayor de Int.

Dado que una cepa himA- es deficiente en el establecimiento de la lisogenia (lambda forma placas claras, Miller y Friedman, 1980 y tabla 2) y en permitir el desarrollo de fagos cin- (Williams et al, 1977 y tabla 2) sólo se determinó el índice de viabilidad celular (cuenta viable de células sobrevivientes a la infección de fagos corregida por centros infectivos) permitidos por opc-cin- y opc+cin-. En la infección con fagos opc+cin- se obtuvo un índice de viabilidad celular alto, debido probablemente a que es improductiva la infección permitiendo el crecimiento bacteriano. Para la infección con fagos cII68 se obtuvo un índice de viabilidad 1000

## AUXILIAR

## INDICE DE INTEGRACION

x 10<sup>5</sup>

---

opc+	0.1
opc1	5.7
opc2	12.0
opc3	6.2
opc4	7.2
opc5	3.6
opc6	1.7
cII68	4.0
sib3cII68	1740.0

---

Tabla 5. Eficiencia de las mutantes *opc-* para promover recombinación integrativa.- Se infectó la cepa SA731*recA*-(*int2red114imm434cII41gal8*) a una mdi de 10 de cada fago. Todos los fagos utilizados llevan la mutación *cI857*. Además los fagos *opc+* y *opc-* llevan los marcadores *HindIIIred114cin1cII68*. Los números en la tabla representan el índice de integración que significa los profagos escindidos por recombinación integrativa (fagos transductores de *gal*) por centro infectivo.



veces menor que el caso cin-, probablemente como resultado de un alto grado de lisis celular. Por otra parte las infecciones con los mutantes opc-cin- dieron como resultado una reducción de 10 a 20 veces en el índice de viabilidad con respecto al caso opc+cin-, tal vez debido a que estos fagos sintetizan represor (forman placas turbias en himA-) {Datos no mostrados}.

f) **Tasa de eclosión.**- la mutación cin1 se localiza en la región 'Y' del operón PR (Wulff, 1976) y además de crear un promotor, incrementa la terminación en tR1 (Rosenberg et al, 1978). Las funciones de replicación se transcriben a partir de pR, pero tR1 se encuentra previo a estos genes. Con el fin de examinar si existían diferencias en la producción de progenie entre fagos opc+cin- y opc-cin- se realizó un ensayo de tasa de eclosión tanto en una cepa himA+ como en una himA- donde el efecto de cin- resulta más aparente (tabla 7).

Cuando el ensayo se efectúa en una cepa silvestre, no se encuentran diferencias aparentes para ningún caso (columna 1). Resultados similares se obtienen cuando se utiliza himA-.

La explicación de que en la cepa himA- se obtenga progenie para fagos cin- puede estar en la temperatura de incubación utilizada. Cuando el fago lleva la mutación cI857 (ts) el efecto letal de himA- sobre cin- sólo se observa a 32°C pero no a 42°C (tabla 2) donde el fago sí forma placas que son aparentemente normales (claras). El ensayo de tasa de eclosión se realizó a 39°C donde el represor no es funcional.

FAGO	Frecuencia de Lisogenia
cII+	1.0
cII68	$7.3 \times 10^{-3}$
cinlcII68	1.0
opc1	0.7
opc4	0.4
opc6	0.4

Tabla 6. Frecuencia de lisogenia de mutantes opc-.- Los valores de la columna representan la frecuencia de lisogenia normalizados con centros infectivos. El ensayo se realizó en la cepa S165 (himA+) a una mdi de 10 de cada fago. El tiempo de incubación fue de 90 min a 32°C. Todos los fagos llevan la mutación gI857 y en adición los fagos opc-, llevan la mutación cin1 como marcador relevante.

Aunque en este experimento se eliminó la participación del represor por ser termosensible, no parece observarse un efecto por parte del promotor pcin, ni del terminador tR1; sin embargo hay que hacer notar que se utilizó una mdí de 10 que podría estar enmascarando algún efecto.

### III. MAPEO INICIAL DE LAS MUTACIONES opc.-

a) **Mapeo genético.**- Para la localización genética de las mutaciones opc-, en primer lugar se determinó si estas se encontraban a la izquierda ó a la derecha del sitio att. Para llevar acabo esto se realizaron las cruzas mostradas en la fig. 18.

Sólo los recombinantes que llevan el brazo derecho de las mutantes opc- (B, en la fig. 18) exhiben tanto el fenotipo de placa roja como el de plaqueo en himA- de los progenitores opc-, indicando que las mutaciones se localizan a la derecha de att.

Se probaron 3 mutantes opc- (1, 4 y 10) y estas se localizaron a la derecha de int y xis (a la derecha de bio11, recombinantes A, en la fig. 19) ya que cuando adquieren la sustitución bio11 conservan el fenotipo turbio en himA- (el fago bio11opc+cin- no plaquea).

Cuando se mapeó con respecto a la región de inmunidad (mutantes opc 1, 4 y 10) se encontró que de las recombinantes imm434 turbias generadas (recombinación B, fig. 19) sólo una parte de ellas plaqueaba en himA- (fenotipo ligeramente turbio). Esto en principio indicaría que las mutaciones se localizan a la derecha de

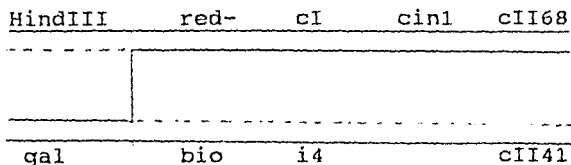
FAGO	TASA DE ECLOSION	
	himA+	himA-
cII68	1.4	-
cin1cII68	4.6	5.5
opc1	1.8	2.3
opc4	1.4	2.6
opc10	3.0	4.0

Tabla 7. Tasa de Eclosión de mutantes opc-.- El ensayo se realizó por infección de las cepas himA+ (S165) y himA- a una mdi de 10 de cada fago. La temperatura de incubación fué de 39°C por 30 min. Los números en la tabla representan la tasa de eclosión dividida entre centros infectivos que se calcularon en la cepa Q1 (para más detalle ver la sección de material y métodos). Todos los fagos llevan la mutación gI857, y en adición, los fagos opc-, llevan la mutación cin1 como marcador relevante.

imm434 y cuantificación de la frecuencia de esta recombinación podría dar la localización definida de las mutaciones; sin embargo de la recombinación con el fago opc+cin- se obtuvieron resultados similares.

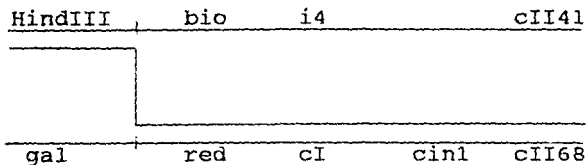
Cuando en vez de utilizar para la recombinación al fago imm434O29 (B, fig. 19) se utiliza el fago imm434cII68 (C, fig. 19) (recombinación sólo de opc1), al probar las recombinantes imm434 turbias que se generaron, éstas no plaquean en himA- (igual que opc+cin-) indicando que sólo se rescata la mutación cin1 pero no opc1. Estos resultados sugieren que la mutación se encuentra dentro de la región de inmunidad cI.

Por otra parte, cuando se recombinan opc+cin- y opc-cin- (opc 1, 4 y 10) con el fago imm21Oam29 (D, fig. 19) para preguntar si la mutación se encontraba a la derecha de la región de inmunidad de imm21 e izquierda de Oam29, no se encontraron diferencias entre los recombinantes imm21O+ de opc+ y opc- (todos los recombinantes crecen ligeramente turbios en himA-). Probablemente la explicación de los fenotipos turbios en himA- de los recombinantes imm434 (recombinación: B, fig. 19) se deba a que el efecto de himA- (defecto en el establecimiento de la lisogenia) no se observa con estos fagos (Miller, 1980).

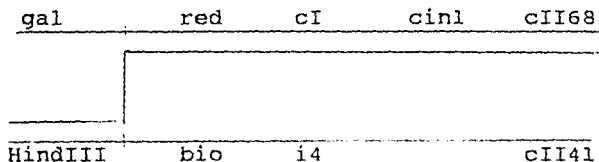


B  
A

A)



B)



**Fig. 18. Mapeo genético de opc- con respecto a att.** Para conocer de que lado, con respecto a att, se encontraban las mutaciones opc- se realizaron las cruzas esquematizadas en la figura, que se efectuaron como se describe en material y métodos. Se rescataron en forma independiente los brazos derecho e izquierdo de los 21 candidatos mutantes, que dan origen a los recombinantes gal8red14cI857cin1cII68 (B) y HindIIIbio11imm434cII41 (A). Con estos recombinantes se generaron fagos homólogos a los originales; los que después de purificados y propagados se probaron en el ensayo de placa roja y plaqueo en himA-.

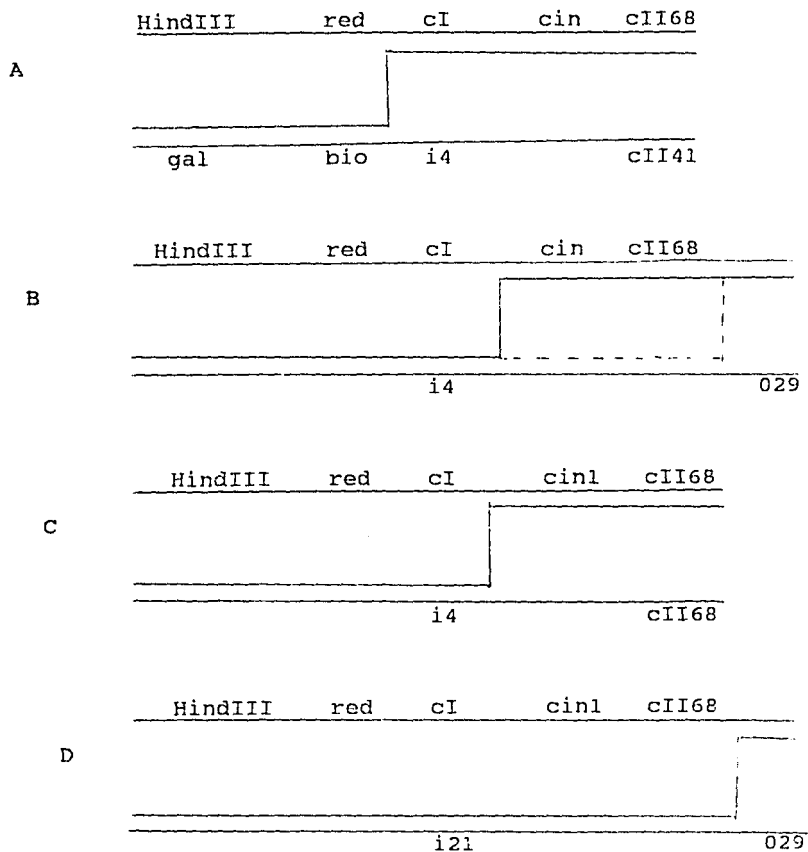


Fig. 19. Mapeo genético de *opc*-con respecto a *bio* y *cI*.

Fig. 19. Mapeo genético de opc- con respecto a bio y gI. Para saber si las mutaciones se encontraban a la derecha de los genes int y xis se obtuvieron los recombinantes gal8bio11cI857cin1cII68 por medio de la recombinación mostrada en A) de opc+ . opc 1, 4 y 10. los recombinantes se seleccionaron en la cepa S165(P2) donde sólo crecen los fagos bio y se seleccionaron los que llevaran inmunidad gI. Para saber si las mutaciones se localizaban a la derecha de la región de inmunidad imm434 inicialmente se efectuaron cruzas como las descritas en B), donde se seleccionaron las recombinantes imm434 turbias por crecimiento en la cepa M72 ( $\lambda$ ) ó se tomaron inicialmente de la cepa S165 y después de probar inmunidad (picando) se seleccionaron las placas imm434. Para el fago opc+ se obtuvo una frecuencia de recombinación de  $7.8 \times 10^{-3}$ , para opc1 de  $2 \times 10^{-3}$ , para opc2 de  $3.7 \times 10^{-3}$ , opc3  $1 \times 10^{-3}$ , opc4  $3.6 \times 10^{-3}$ , opc5  $6.4 \times 10^{-3}$  y opc6 de  $9 \times 10^{-3}$  de recombinantes turbias imm434. Estas se probaron por plaqueo en himA-. Cuando las cruzas se realizaron como se muestra en C), los recombinantes imm434 turbios se seleccionaron en la cepa S165 a 42°C (sólo se efectuó para opc1). Después de probar sus marcadores, se examinó sobre himA-. Cuando se quiso preguntar en relación a la región de inmunidad imm21 se efectuó la crusa mostrada en D), donde los recombinantes se seleccionaron en la cepa S601( $\lambda$ )recA-, donde sólo crecen los recombinantes imm210-, los cuáles se probaron en himA-. Se obtuvo un frecuencia de recombinación de  $2.4 \times 10^{-4}$  para opc+; de  $2.71 \times 10^{-4}$  para opc1; de  $1.2 \times 10^{-4}$  para opc4 y de  $2 \times 10^{-4}$  para opc 10. En general se probaron de 10 a 100 placas de cada recombinante.



b) Mapeo por fásmidos (recombinación entre fagos y plásmidos).-

Los experimentos preeliminares de mapeo genético, sugerían que la mutación opc se localizaba en la región de inmunidad cI. Uno de los fenotipos de la mutación opc1 es revertir el efecto de la mutación cin1 en cepas ihf-. Como la mutación cin1 se encuentra en el operón pR, resultó atractivo realizar estudios funcionales y de mapeo más detallados en este operón, por lo que se clonó la región que abarca del promotor pR hasta parte del gene O, de los fagos opc+ (pOPC0), opc- (pOPC1) y  $\lambda$ + (pOPS3) en el vector pBR322. La estructura resultante de estos plásmidos es muy similar a la de los plásmidos dV (Matsubara, 1981). Al infectar bacterias portadoras de los plásmidos pOPC0, pOPC1 y pOPS3 con fagos de inmunidad cI, todas ellas resultaron inmunes a la infección, por lo que no se observó formación de placas líticas. Probablemente este resultado este mediado por la proteína Cro (ver más adelante). Por estos resultados no fué posible rescatar la mutación opc1 de los plásmidos pOPC con fagos cI, por lo que se probó el rescate con fagos imm434.

Los plásmidos que se utilizaron fueron: pOPC1, con los marcadores opc-, cin-; pOPC0, con los marcadores opc+, cin-; pOPS3, con los marcadores opc+, cin+; pAPC+, derivado de pOPC0 pero que carece de la región pR-cro' y pAPC-, derivado de pOPC1 y que también carece de la región pR-cro'. Los fagos que se usaron para la recombinación con los plásmidos, fueron: imm434cII68; b2 imm434cII41 cuyo DNA es más pequeño por llevar la deleción b2, y tiene una mutación diferente a los plásmidos en el gene cII y el

PLASMIDO/FAGO	% DE FAGOS TURBIOS RESCATADOS	FENOTIPO	
		himA+	himA-
A)			
pAPC0 / i4cII68	18.0	15 t	0
pAPC1 / i4cII68	37.5	19 t	0
pOPC0 / b2 i4cII41	1.8	3 t	3 c
pOPC1 / b2 i4cII41	3.3	5 t	5 c
pOPS3 / b2 i4cII41	0.8	2 t	2 c
B)			
pAPC0 / b2 i4tscII68	1.0	21 t	0
pAPC1 / "	1.6	19 t	0
pOPC0 / "	1.1	7 t	0
pOPC1 / "	0.0	-	-
pOPS3 / "	0.0	-	-

C)

cI' . cin . cII . O'

Tabla 8. Prueba de rescate de la mutación *opc-* por medio de fásmidos.

**Tabla 8. Prueba de rescate de la mutación *opc-* por medio de fásmidos.** Las recombinaciones entre los fagos con inmunidad *imm434* y los plásmidos se llevaron acabo como se muestra en los incisos A) y B) de la tabla. Después de propagar los fagos en las cepas portadoras de los plásmidos para permitir la recombinación, se seleccionaron lisógenas resistentes a ampicilina (portadoras de fásmidos); que posteriormente se indujeron para obtener lisados que se inactivaron con citrato de sodio por 60 min para eliminar los fásmidos y solamente recuperar los fagos. El fenotipo de la progenie se analizó en las cepas *himA+* y *himA-*. Los porcentajes de fagos turbios rescatados se detectaron en una cepa *himA+* (Q1). En el inciso c), se señala los principales puntos (.) en que se pudo haber llevado la recombinación (ver texto para más detalle).

fago b2 imm434cII68.

Como se puede apreciar de los resultados de la tabla 8, al plaquear los fagos turbios que se obtuvieron, sobre la cepa himA- se observan 2 fenotipos: Los que no forman placas (recombinación con los fagos imm434cII68 y b2 imm434cII68) y los que forman placas claras (recombinación con los fagos b2 imm434cII41). Estos resultados indican, que en el primer caso sólo se rescató la mutación cin y en el segundo que se generaron recombinantes cII+. Probablemente, la mutación opc se encuentre en la región heteroinmune y por eso no fué posible rescatarla. Estos resultados apoyan los obtenidos por mapeo genético.

**c) Mapeo por intercambio de fragmentos de restricción AvaI-AvaI entre los plásmidos pOPC0, pOPC1 y pOPS3.**-Tanto las bacterias con los plásmidos pOPC0 como con los plásmidos pOPC1 fueron inmunes a la infección de fagos cI; sin embargo cuando estas se infectaron con el fago imm434cII68 se encontró, que las bacterias con el plásmido pOPC1 (opc-) fueron más resistentes a la propagación de los fagos que las portadoras del plásmido pOPC0 (opc+)[ver tabla 9]. Como la única diferencia entre ambos plásmidos es la mutación opc1, este resultado sugiere que esta mutación afecta los niveles de interferencia del plásmido pOPC1 para la propagación de fagos imm434cII68 y que es posible observar el efecto fenotípico de la mutación en el plásmido.

En base a este resultado y a la posible localización de la mutación opc1 en la región de inmunidad cI, se intercambiaron los fragmentos de restricción AvaI-AvaI entre los plásmidos para ver el grado de interferencia contra los fagos imm434. El fragmento AvaI-AvaI de 630 pb, contiene el promotor pR y la mayor parte del gene cro (coordenadas 38214). Además de utilizar los plásmidos POPC0 y POPC1 se usó al plasmido POPS3 (opc+ cin+). Cada uno de los 3 juegos de plásmidos contiene a su vez 3 plásmidos, el original con el fragmento AvaI-AvaI propio y otros 2 plásmidos que conservan la región cin-cII-O' (B en la tabla 9) y que llevan el fragmento AvaI-AvaI (A en la tabla 9) de los otros 2 plásmidos progenitores.

Todas las construcciones que contienen la región pR-cro (A en la tabla 9) del plásmido POPC1 (opc-) dan un fenotipo mutante, es decir, la interferencia del plaqueo del fago imm434cII68 es mayor en estos casos que la de los plásmidos POPC0 y POPS3 ( 3 veces). Estos datos nos indican que la mutación se localiza en la región pR-cro. El plásmido recombinante POPS3 con la región pR-cro del plásmido POPC1 interfiere el doble que el plásmido POPC1; probablemente debido a que el plásmido POPS3 no lleva la mutación cin1 (ver discusión). Todas las construcciones mostraron un patrón igual de interferencia cuando se plaquearon varios fagos cI y el fago imm434cin1 (inhibición total); con el plaqueo del fago imm1, sólo se observó un grado de interferencia con los plásmidos que muestran un fenotipo mutante (ver discusión). El vector pBR322, no mostró algún grado de interferencia.

PLASMIDO RECOMBINANTE		INDICE DE INTERFERENCIA		
A	B	1,2,3,5	4	6
pR cro	tR1 cII			
1) pOPC0	pOPC0	0	0.5	1
pOPC1	"	0	0.16	0.5
pOPS3	"	0	0.5	1
2) pOPC1	pOPC1	0	0.16	0.5
pOPC0	"	0	0.5	1
pOPS3	"	0	0.5	1
3) pOPS3	pOPS3	0	0.5	1
pOPC0	"	0	0.5	1
pOPC1	"	0	0.08	0.5
4)	pBR322	1	1	1

Tabla 9. Mapeo de la mutación opc mediante el intercambio de los fragmentos de restricción AvaI-AvaI entre los plásmidos pOPC, pOPC1 y pOPS3. El fragmento AvaI-AvaI que contiene a pR y cro se intercambió entre los 3 plásmidos y se midió el grado de interferencia de estas construcciones recombinantes sobre el plaqueo (e.o.p.) de diferentes fagos. En la tabla, A y B representan las partes de que están compuestas los diferentes plásmidos progenitores y recombinantes (A, fragmento AvaI-AvaI). Se probaron 4 candidatos aislados independientemente de cada construcción. Los fagos utilizados para medir la interferencia fueron: 1) cI857cII68; 2) cI857cinlcII68; 3) cI857opc1cinlcII68; imm434cII68; 5) imm434cinlcII68 y 6) imm21cII-.

#### IV. EFECTO DE LAS MUTACIONES opc Y cin EN PLASMIDOS Y FAGOS SOBRE LAS INTERFERENCIAS TIPOS A Y B.

a) Interferencia de plásmidos pOPC y sus derivados.- Con la finalidad de conocer más acerca del efecto de la mutación opc1 en la interferencia del plásmido pOPC1, se probó la eficiencia de plaqueo de fagos con inmunidad cI e imm434 con diferentes mutaciones en el operón pR, y el fago con inmunidad imm21 sobre cepas que llevaban por separado cada uno de los siguientes plásmidos: pOPC0, pOPC1, pOPS3 y pBR322.

La interferencia de los plásmidos pOPC0, pOPC1 y pOPS3 fué igual para los fagos con inmunidad cI, independientemente de las mutaciones que llevarán (tabla 10). En todos estos casos se observó una inhibición total del plaqueo de los fagos ( $\sim 10^{-7}$ ).

Para la interferencia de los fagos con inmunidad imm434 se observó que el efecto del plásmido pOPC1 fué mayor que el de pOPS3 y la interferencia de este fué mayor que la de pOPC0, de esta forma la intensidad de la interferencia podría resumirse en el gradiente pOPC1>pOPS3>pOPC0. El único caso para el que no se encontró diferencias entre los tres plásmidos fué con el fago imm434cin1; aquí al igual que con los fagos cI se obtuvo una inhibición total del plaqueo. Al parecer, de todas las mutaciones del operón pR que se probaron, sólo cin1 tuvo un efecto sobre la eficiencia de plaqueo (en este caso negativo). ya que ni mutaciones en cII (ó su contraparte cII+), en el promotor pE (cy), ó en el represor afectaron el proceso (tabla 10). Estos resultados descartan la

FAGO	PLASMIDO			
	pBRJ22	popCO	popC1	popS3
ci857cII68	1	0*	0*	0
ci857cinlcII68	1	0*	0*	0
ci857cinlcII68opc1	1	0*	0*	0
i434cII68	1	0.47	0.03	0.26
i434cinlcII68	1	0*	0*	0
i434cI-	1	0.53	0.05	0.13
i434cy3048cII68	1	0.44	0.09	0.12
i434cy42	1	0.42	0.08	0.12
i21cII-	1	0.83	0.68	0.73

Tabla 10. Eficiencia de plaqueo de diferentes fagos en cepas que llevan los plásmidos con las regiones opc+ y opc-.



**Tabla 10. Eficiencia de plaqueo de diferentes fagos en cepas que llevan los plásmidos con las regiones *opc+* y *opc-*.** Los números de la tabla representan la eficiencia de plaqueo (e.o.p.) de los diferentes fagos en las cepas portadoras de los plásmidos. Esta eficiencia refleja el nivel de interferencia de los plásmidos sobre el crecimiento de los fagos. La e.o.p. se calculó dividiendo el número de placas obtenidas del plaqueo sobre bacterias con x plásmido entre el número de placas obtenido del plaqueo del mismo virus a la misma concentración en la cepa que lleva el vector pBR322. el símbolo (\*) significa que se obtuvieron placas fantasmas a una concentración de  $10^8$ . En pOPC1, las placas son turbias e irregulares, excepto para imm21 y las placas en pOPC0 y pOPS3 son irregulares pero claras.

posibilidad de que la interferencia se deba a la expresión del represor del fago vía activación de su promotor **pE** por la proteína CII68 del plásmido. Por otro lado se observó un efecto discreto y no reproducible en la eficiencia de plaqueo del fago imm21.

b) Interferencia de plásmidos sin la región del autorepresor.- Al comparar los niveles de interferencia entre los plásmidos pAPC0 y pAPC1 (que carecen de la región **pR-cro**) se encontró que estos fueron iguales para todos los fagos examinados, así las diferencias observadas con los plásmidos progenitores pOPC0 y pOPC1 cuando se usaron fagos imm434, desaparecen (tabla 11); este resultado concuerda con el hecho de que la mutación se encuentre en la región **pR-cro**. Por otro parte se apreció que la intensidad de la interferencia disminuyó cuando se eliminó la región mencionada, de tal forma que los fagos con inmunidad cI que no formaban placas en bacterias con los plásmidos pOPC, pudieron propagarse en bacterias con plásmidos pAPC (aunque todavía con cierta interferencia). Es interesante hacer notar que el fago con la mutación opc1 (**opc-cin-**) resultó ser más resistente a la interferencia de los plásmidos pAPC que su progenitor (**opc+cin-**) y aún que el fago cin+ (tabla 11). Así también se puede establecer un gradiente, aunque en este caso de resistencia a la interferencia por parte de los fagos: **opc-cin-** > **opc+cin+** > **opc+cin-**.

ESTE LIBRO NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

FAGO INFECTANTE pBR322	INDICE DE INTERFERENCIA				
	popCO	popC1	papCO	papC1	
cI857cII68	0	0	0.5	0.5	1
cI857cinlcII68	0	0	0.16	0.16	1
cI857cinlcII68opcl	0	0	1	1	1
i434cII68	0.66	0.16	1	1	1
1434cinlcII68	0.08	0	0.16	0.16	1
i434N-nin5	1	0.5	1	1	1
i21cII41	1	1	1	1	1

Tabla 11. Interferencia de los plásmidos papCO y papC1, que carecen de la región del autorepresor sobre el desarrollo de fagos.

En la tabla se presenta la comparación de los niveles de interferencia de los plásmidos popCO y popC1 con los plasmidos papCO y papC1 que se derivan de los anteriores pero que se les eliminó la región del autorepresor. La cepa portadora de cada uno de los plásmidos es Q1.

c) Efecto de las mutaciones opc4 y opc10 en la interferencia y su comparación con opc1.— Con la finalidad de probar el efecto de las mutaciones opc4 y opc10 sobre la interferencia del desarrollo de fagos en el sistema de plásmidos, se realizaron construcciones plasmídicas similares a la del plásmido pOPC1 con las regiones del operón pR de estos fagos (ver la sección de Material y Métodos).

Los niveles de interferencia obtenidos tanto para el plásmido con la mutación opc4 (pOPC4) como con la mutación opc10 fueron iguales a los obtenidos con la mutación opc1 (pOPC1) [tabla 12]. Estos resultados en conjunto con los obtenidos en otros ensayos, sugieren que las 3 mutaciones afectan la misma región.

d) La participación de las secuencias del origen en la Interferencia tipo B.— Los plásmidos de la serie pOPC fueron capaces de interferir con gran intensidad a fagos con inmunidad ci y con una intensidad menor a fagos con inmunidad imm434; sin embargo cuando se eliminó la región pR-cro de los plásmidos, la intensidad de los dos tipos de interferencia disminuyó. En la región que conservan los plásmidos (región del origen) hay 3 secuencias que podrían intervenir en este fenómeno: ice, oop y ori. La región que contiene a oop genera un transcrito que podría actuar en **trans**. Para probar si sólo una región con la secuencia oop era capaz de inhibir el desarrollo de los fagos, se clonó esta región aislada de las otras dos secuencias (pOO2); además se realizaron 2 construcciones, una con las secuencias ice-ori (sin oop, denominada pPP1) y otra con las secuencias oop-ori (sin ice, denominada pOR1).

PLASMIDO	INTERFERENCIA			
	1, 2, 3	4	5	6
pOPC0	0	0.66	0.66	0.95
pOPC1	0	0.16	0.16	0.75
pOPC4	0	0.16	0.16	0.75
pOPC10	0	0.16	0.16	0.75
pOPS3	0	0.66	0.66	0.85
pBR322	1	1	1	1

Tabla 12. Efecto de las mutaciones opc4 y opc10 en la interferencia y su comparación con opc1. A partir de los fagos mutantes opc4 y opc10 se realizaron construcciones iguales a la de pOPC1 para probar y comparar el grado de interferencia. El plásmido pOPC4 lleva la región de opc4 y el plásmido pOPC10 lleva la región de opc10. Para esta prueba se utilizaron los siguientes fagos: 1) cI857cII68; 2) cI857cinIcII68; 3) cI857cinIcII68opc1; 4) imm434cII68; 5) imm434cI- y 6) imm21cII-.

Al analizar los niveles de interferencia de las construcciones, se encontró que el plásmido pOO2 (oop) y el plásmido pOR1 (oop-ori) no interfirieron con el plaqueo de los fagos y de hecho se comportaron como el plásmido pBR322 (tabla 13). Estos resultados sugieren que si oop juega algún papel importante en la interferencia, parece requerir de la participación del sitio ice. Interesantemente el plásmido pPP1 (ice-ori) que carece de oop, tuvo un grado de interferencia similar al plásmido pAPCO (tabla 15); resultado que parece apoyar la importancia del sitio ice en este proceso; aunque no es claro el mecanismo por el cual podría actuar (sobre todo en trans). Es evidente que se requiere efectuar más experimentos para poder elucidar el papel de las secuencias de la región del origen en la interferencia tipo B.

#### V. ACTIVIDAD DEL PROMOTOR pR CON LA MUTACION opc1.-

Las evidencias indicaban que la mutación opc se localizaba en el promotor pR, aunque no se podía descartar que estuviera en el gene cro. Con el propósito de estudiar la actividad del promotor pR separado del gene cro, tanto del plásmido con la región del fago mutante (pOPC1) como del plásmido con la región silvestre (pOPC0), se clonaron ambos promotores en el vector pK0 para medir su actividad por medio de la expresión de la galactocinasa.

El promotor que proviene de la región mutante (pPR1) produjo cerca de 3 veces menos unidades de galactocinasa que el promotor silvestre (tabla 14). Estos resultados se obtuvieron para los 3

PLASMIDO	INTERFERENCIA TIPO B					
	1	2	3	4	5	6
p002	1	1	1	1	1	1
p001	1	1	1	1	1	1
pOR1	1	1	1	1	1	1
pPP1	0.4	0.10	1	0.60	0.10	1
pAPC0	0.5	0.16	1	0.85	0.16	1
pBR322	1	1	1	1	1	1

Tabla 13. Participación de los sitios oop, ice y ori en la interferencia tipo B. A partir de plásmido pAPC0 que contiene la región del origen, se generaron los plásmidos p002 y p001 (ambos con el sitio oop), el plásmido pOR1 (con los sitios oop y ori) y el plásmido pPP1 (con los sitios ice y ori). A estas construcciones se les probó su capacidad de interferencia y se les comparó con su plásmido progenitor. Los numeros del 1 al 6 de la columna de la interferencia tipo B representan los fagos utilizados en el experimento, que son los mismos que los de la tabla 12.

candidatos que se probaron de cada una de las construcciones y sugieren que su promotor es menos activo y apoyan el que la mutación opc se encuentre en ó afecte la actividad de **pR**. Sin embargo llama la atención que la actividad del promotor **pR** silvestre (pPR0) que se supone un promotor de fuerza media fué 6 veces más baja que la del promotor **pgal** (pKG1800).



PLASMIDO	UNIDADES DE GALACTOCINASA	EXPRESSION RELATIVA
pPRO:		
0.3	255	12
0.4	235	11
0.5	235	11
pPR1:		
1.7	100	5
1.19	87	4
1.20	75	4
pK01	22	1
pKG1800	1445	66

**Tabla 14. Actividad del promotor pR con la mutación opcl.**

El promotor pR silvestre y con la mutación opcl se clonaron en el vector pK01 para medir su actividad por medio de la expresión de galactocinasa. El plásmido pPRO lleva el promotor silvestre y el plásmido pPR1, el promotor con la mutación opcl. Se probaron 3 clonas diferentes de cada construcción. El ensayo se realizó en la cepa SA1943 como se describe en material y métodos. Se tomó arbitrariamente las unidades obtenidas con pK01 (sin promotor) como 1 y en base a este valor se da la expresión relativa de los promotores.

## VI. EFECTO DE LAS MUTACIONES cin1 Y opc1 SOBRE EL MANTENIMIENTO DE LOS PLÁSMIDOS EN CEPAS ihf-.-

El efecto de la mutación opc se observó en varios ensayos con fagos así como en experimentos con plásmidos. Con la finalidad de probar si el efecto de opc- sobre cin- encontrado en fagos al infectar cepas ihf- (ver tabla 2), se observaba en plásmidos con estos marcadores, se transformó cepas ihf-.

Interesantemente en la transformación con el plásmido pOPCO (opc+cin-) no se obtuvieron colonias resistentes a la ampicilina, tanto en las cepas himA- e hip-, mientras que con el plásmido pOPC1 (opc-cin-) si se consiguió seleccionar este tipo de colonias (tabla 15). Estos resultados semejan los descritos con los fagos, sin embargo hay que hacer notar que el tratar de propagarlas resultaba dificultoso ya que su crecimiento era pobre e inestable. En la transformación con el plásmido pOPS3 (opc+cin+) se obtuvieron colonias estables con ambas cepas ihf-, también cuando se transformó con el plásmido pAPCO ó con el plásmido pAPC1 (ambos cin- y sin la región pR-cro) se obtuvieron colonias estables en las 2 cepas ihf- al igual que el vector control pBR322 (tabla 15). Todos los plásmidos transformaron establemente la cepa ihf+

PLASMIDO	himA-	hip-	ihf+
pOPC0	-	-	+
pOPC1	+	+	+
pOPS3	+	ND	+
pAPC0	+	ND	+
pAPC1	+	ND	+
pBR322	+	+	+

tabla 15. Efecto de las mutaciones cin1 y opcl sobre el mantenimiento de los plásmidos en cepas ihf-.

Las cepas ihf+ ó ihf- (himA- ó hip) se transformaron con los plásmidos pOPC0 (opc+ cin1), pOPC1 (opcl cin1), pOPS3 (opc+ cin+), pAPC0 (cin1), pAPC1 (cin1) y pBR322. se utilizó concentraciones de 50 a 300 ng de DNA en todos los casos. ND, significa no determinado.

## DISCUSION

En el presente trabajo se aislaron mutantes del bacteriófago lambda con un fenotipo similar a mutantes sib en el ensayo de placa roja, y de acuerdo a las bases del método de selección empleado, las mutaciones con este fenotipo, pueden ser alteraciones que provoquen ya sea directa ó indirectamente un incremento en la actividad de integrasa, tales como: mutaciones en el gene int que aumenten la función de recombinación, tipo inth; mutaciones en sib que eleven la estabilidad de su RNA mensajero; mutaciones en el promotor pI que le den una actividad constitutiva; ó una reversión de cII- a cII+ que traería como resultado una mayor cantidad del transcrito del gene int; también podrían obtenerse mutaciones en regiones de control que regulen alguno de los factores implicados en la expresión de int diferentes a los mencionados arriba como las seleccionadas en este trabajo.

Las mutantes opc aisladas, si bien exhiben un fenotipo Sib-, mapean y tienen características diferentes a las que tienen las mutantes sib. Un punto importante aunque oscuro para este resultado, probablemente esté en el modo de selección, ya que se eligieron placas rojas iguales que las del fago sib3 que fueron más intensas que las de sib1 y sib2, hecho que no tiene una explicación satisfactoria, ya que en otros ensayos no se observaron diferencias entre estas. Una posibilidad que no puede descartarse es que el fago sib3 tuviera otra mutación que favoreciera el fenotipo observado.

El fenotipo en placa roja de las mutantes aisladas, sugería un incremento en la expresión ó en la actividad de integrasa. Sin embargo la eficiencia para promover recombinación integrativa de estas fué igual que la del fago cII68, y cerca de 3 ordenes de magnitud menos que la del fago sib3. Así, estos resultados indicaron que los niveles de integrasa de los fagos opc- no estan afectados de manera considerable, aunque estos valores fueron mayores que los de los fagos opc+ (como 10 veces). Tal vez esta diferencia sea un factor importante para explicar el fenotipo en el ensayo de selección, donde las placas de fagos opc- fueron rojas en un tiempo más corto que la de los fagos opc+.

Los experimentos de mapeo por cruza, sugerían que la mutación opc se encontraba en la región de inmunidad cI, y también descartaron la posibilidad de que la mutación estuviera en sib, int, pI y cII; resultados que son consistentes con los ensayos en que se probaron estos marcadores.

Como la mutación opc revierte el efecto de la mutación cin1, la explicación de que no se encontraran adyacentes no resultaba clara, por lo que se clonó la región que cubre del promotor pR hasta parte del gene O, para mapear y hacer estudios funcionales con los plásmidos.

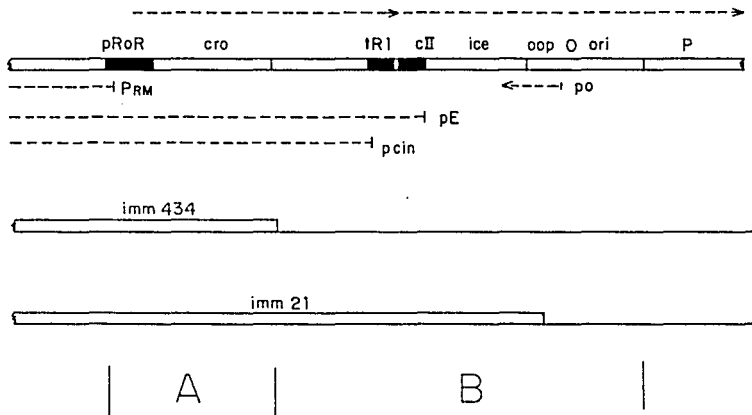
Al infectar las bacterias portadoras de los plásmidos, con fagos heteroinmunes imm434, se encontró que el plásmido POPC1 (opc-) interfería más que el plásmido POPC0 (opc+) en la propagación de los virus; de esta forma, estos resultados demostraban que la

mutación opc estaba contenida en esta región y a su vez que era posible observar el efecto de ésta en el plásmido. El hecho de que la mutación no pudiera rescatarse del plásmido pOPC1 con fagos imm434, apoya la evidencia de que la mutación opc se encontrara en la región de inmunidad cI, obtenida en las recombinaciones con fagos. La localización fué más precisa al intercambiar la región pR-cro' (fragmento AvaI-AvaI) entre los plásmidos, ya que las construcciones que contenían el fragmento AvaI-AvaI del plásmido pOPC1 dieron el fenotipo mutante en la prueba de interferencia, indicando que la mutación se encontraba en el promotor pR ó en el gene cro.

El plásmido dv y plásmidos recombinantes que contienen la región pR-ori interfieren con el crecimiento de los bacteriófagos con inmunidad cI ó imm434 (Matsubara, 1972; 1981) por un mecanismo que implica la inhibición de su replicación (Matsubara, 1981). Existen al menos 2 tipos de interferencia ó incompatibilidad: La Tipo A (observada con los fagos homoinmunes cI), que involucra la región del autorepresor y que es mediada por la acción de la proteína Cro (autorepresor) del plásmido sobre el promotor-operador pRoR del fago. La intensidad de la interferencia depende de los niveles de Cro, los cuáles correlacionan con la fuerza del promotor pRoR. Así la interferencia se aumenta cuando se incrementa la constitutividad de pRoR (Murotsu y Matsubara, 1980; Matsubara, 1981). Por otro lado se ha observado que la susceptibilidad de los fagos a la interferencia, depende del grado de constitutividad de pRoR; si esta es fuerte la susceptibilidad es baja y viceversa

(Matsubara, 1974). La interferencia Tipo B (observada con los fagos heteroinmunes imm434) que no es tan marcada como la anterior, involucra la región del origen (desde ice hasta probablemente ori) aunque se desconoce(n) la(s) secuencia(s) responsable(s) así como el mecanismo de cómo ocurre esta (fig. 20); por otro lado se sabe que el efecto es más pronunciado cuando esta región es sujeta a transcripción (Matsubara, 1981).

En el presente trabajo, para la interferencia de los plásmidos sobre el crecimiento de fagos imm434, se observó un gradiente, donde la intensidad en orden decreciente fué POPC1>POPS3>POPC0. Una posible explicación, para el aumento en la intensidad de la interferencia, cuando el plásmido lleva la mutación opc1 (POPC1), es que esta incrementa la fuerza de pR (una constitutividad mayor) y por lo tanto el nivel de transcripción en la región del origen. Por otra parte, cuando el plásmido lleva la mutación cin1 (POPC0), la interferencia disminuye con respecto a la secuencia silvestre (POPS3); presumiblemente por que la mutación cin1, que crea un promotor que funciona en sentido contrario a pR e incrementa la terminación de tR1 (Wulff, 1976; Wulff et al, 1980), disminuye el nivel de transcripción que se origina en pR, pasa tR1 y atraviesa la región del origen. De esta forma se tienen 2 mutaciones cuyo efecto en la interferencia es contrario; hay que remarcar que el efecto de la mutación opc1 en el plásmido se observa a pesar de que este (POPC1) también lleva la mutación cin1. Para el crecimiento de fagos con inmunidad cI, se obtuvo una inhibición total con los 3 plásmidos. Probablemente no se encontraron



**Fig.20. Comparación de las regiones core de los plásmidos *dv*, *imm434* y *imm21*.** Los plásmidos son derivados de los fagos heteroinmunes. *imm434* y *imm21*. La estructura genética de la región core de los 3 plásmidos es idéntica, excepto en la región de inmunidad que se encuentra señalada con rectángulos en la parte media y baja. Estas regiones son importantes en el fenómeno de incompatibilidad e interferencia. La región A cubre *pRoR* y *cro*. La región B tiene a *tR1*, *cII*, *ice*, y *oop*.



diferencias por que el plásmido pOPCO que tuvo el menor grado de interferencia con los fagos imm434, inhibió totalmente el plaqueo de fagos cI, por lo cuál, niveles mayores no podrían observarse (como sí el sistema se hubiera saturado); El hecho de que se observaran diferencias con el fago imm434 y no con el fago cI es consistente con que la interferencia con este último sea más marcada. Cuando se eliminó la región pR-cro de los plásmidos pOPCO y pOPC1, la interferencia mediada por Cro y la transcripción que se inicia en pR desaparecieron, por lo que la interferencia Tipo B disminuyó en intensidad y esta fue semejante para fagos imm434 y cI. Como al eliminar la región del autorepresor, el efecto de la mutación desaparece, esto confirma la posición de opc1 en esta región.

El fago con la mutación opc1 (opc-cin-) fue más resistente que su fago progenitor (opc+cin-) y aún que el fago silvestre (opc+cin+) a la interferencia (Tipo B) de los plásmidos pAPC. Como puede apreciarse, el orden de acuerdo a su resistencia es: opc-cin->opc+cin+>opc+cin-, el cuál es paralelo al orden del nivel transcripcional propuesto anteriormente y que se relaciona con la fuerza del promotor pR (constitutividad); así mientras más fuerte sea el promotor ó mayor sea el nivel de transcripción de cierta región, mayor será la resistencia a la interferencia.

Hay 2 formas por las que la mutación opc podría provocar un incremento en la fuerza ó constitutividad de pRoR: Ya sea disminuyendo la afinidad del operador oR a la proteína Cro, ó

disminuyendo la afinidad de Cro a oR. El hecho de que la Cro producida por pOPC1 parece funcionar igual que la producida por pOPC0 y pOPS3 para interferir con fagos cI, sugiere en principio que la mutación se encuentra en oR. Al medir la actividad de los promotores pR de las regiones mutante y silvestre, por medio de la expresión de galactocinasa, se encontró que el nivel de actividad del promotor de la región mutante fué 3 veces menor que el del promotor silvestre; resultado que sugiere que la mutación afecta al promotor pR haciéndolo menos activo; hecho que parecería contradecir los resultados que indican una mayor actividad de este. La explicación para esta aparente paradoja puede ser que cuando ambos promotores se encuentran aislados del operón, sin la presencia de los represores CI y Cro, el promotor silvestre es más fuerte que el mutante; sin embargo, cuando se encuentran en el contexto del operón ya sea en el fago ó en un plásmido, la situación se revierte, porque el promotor silvestre estaría sujeto a la represión por parte de Cro y de CI, mientras que el promotor con la mutación opc estaría sujeto a una menor represión que el promotor silvestre y por lo tanto tendría una mayor actividad que este. Los fagos opc- no forman placas en bacterias lisogenas para el fago lambda, ni en bacterias portadoras de plasmidos del tipo pOPC. Estos resultados indican que la mutación opc es del tipo "virulencia restringida" (vr), las cuáles incrementan la constitutividad de pR y se encuentran en oR1 ó en oR2 (las mutantes supervirulentas tienen mutaciones en ambos sitios). Como mutaciones en un sitio ó en el otro, tienen efectos muy similares, es muy

difícil distinguirlas sólo por estudios funcionales (Meyer et al, 1980); por otro lado, la mutación cin- tiene la capacidad de suprimir el defecto de mutaciones pm- (Gussin et al, 1980). De los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se puede precisar el sitio que afecta opc; por otra parte, aunque CI y Cro reconocen a los mismos sitios del operador, la afinidad y la unión dentro de estos es diferente (Meyer et al, 1980), por lo que se ha encontrado que el grado de constitutividad para CI puede no correlacionar con el grado de constitutividad para Cro (Flashman, 1978).

Los fagos con la mutación cin1 tienen la característica de no formar placas en cepas ihf- (Williams et al., 1977; Kikuchi et al., 1985). Esta mutación tiene un doble efecto en el operón pR; crea un nuevo promotor para cI independiente de CII e incrementa la terminación de tR1 (Rosenberg et al., 1978; Gussin et al., 1980). Griffo y col. (1989) sugieren que el bloqueo del crecimiento de fagos cin- en bacterias ihf- se debe a una sobreexpresión del represor CI (por ausencia de IHF), a partir del promotor pcin. Sus resultados indican que en cepas ihf+, la proteína IHF reprime a pcin por unión al sitio IHF que se traslapa con la región -35 de este, evitando la unión de la RNA polimerasa ya sea por obstrucción estérica ó por flexión del DNA de esta zona; sin embargo esta represión no es absoluta, ya que el promotor es activo en ihf+ (5 veces menos). Las mutaciones cnc que revierten el efecto de cin1, inactivan a pcin y se localizan en la región -10 ó -35 de este (Griffo et al., 1989).

Uno de los efectos más intrigantes de las mutaciones opc es que sobrepasan la incapacidad de propagarse de fagos cin- en bacterias ihf-. Una interpretación para este efecto, de acuerdo a las evidencias mencionadas anteriormente, aunado a que opcl parece incrementar la fuerza de pR (una constitutividad mayor), es que al elevarse la transcripción hacia la derecha, esta obstruye la transcripción que se origina en pcin (oclusión de promotores); por lo que la expresión de CI se reduciría a niveles que ya no bloquearían el crecimiento del fago. El hecho de que las placas de opc-cin- sean turbias (en ihf- ó ihf+), indica que la inhibición de pcin por pR (opc-) no es absoluta, aún en cepas ihf+ donde pcin es menos activo. Asimismo, como se pudo apreciar en los experimentos de interferencia con plásmidos, pcin también tiene un efecto de oclusión sobre pR en bacterias ihf+, por lo que se esperaría que este efecto se aumentara en cepas ihf-.

Estos resultados sugieren que pcin, no sólo actúa indirectamente al sobreexpresar CI (efecto en trans), sino que también actúa directamente al obstruir pR (efecto en cis), además cin1 incrementa la terminación de tR1 y aunque esta no ha sido evaluada en condiciones ihf-, podría tener un papel importante para reducir la transcripción en la región del origen (efecto en cis). La participación de los eventos en cis, en la inhibición del crecimiento del fago en ihf- no es clara; ya que el fago c1857cin1, que no se desarrolla en cepas ihf- a 32°C, sí lo hace a 42°C donde el represor no es funcional y fagos cin- con un represor termoestable no crecen en ambas temperaturas, lo que parecería un efecto en

**trans**; sin embargo, la evidencia de que el fago cin no parece inhibir el crecimiento del fago cII- a 32°C en una prueba de complementación sobre ihf- apoyaría un efecto en **cis**. Por otra parte, cuando se midió la tasa de eclosión de fagos cin1 (sin ó con opc1), en ausencia de represor (cI857 a 39°C); no se encontró una diferencia significativa cuando se realizó en ihf+ ó ihf-; tal vez debido a que las condiciones de estos ensayos no fueron las adecuadas ó estos experimentos resultaron burdos para apreciar el efecto en **cis**. Sería interesante realizar estos experimentos con la mutación pam en los fagos en una cepa permisiva. Se sabe que bajo estas condiciones existe una limitación en la síntesis del DNA viral debido a una supresión incompleta de esta mutación (Kourilsky y Gros, 1976).

Interesantemente, el mantenimiento de los plásmidos pOPC en las cepas ihf- semeja el plaqueo de los fagos en estas cepas. Con el plásmido pOPC0 (opc+cin-) no se obtuvieron transformantes en las cepas ihf-, mientras que con el plásmido pOPC1 (opc-cin-) sí, aunque el crecimiento de las colonias fué algo inestable; con el plásmido pOPS3 (opc+cin+) se obtuvieron transformantes estables, y todos los plásmidos transformaron bien la cepa ihf+. Estos resultados sugieren que la inestabilidad en ihf- es causada por cin1 y como este efecto es parcialmente revertido por opc1, la explicación de este resultado podría ser que la actividad incrementada de pcin provoca que el plásmido no se replique (efecto en **cis**). Existe el consenso de que plásmidos que llevan promotores fuertes, se replican pobremente. La mutación opc1 al incrementa: la

fuerza de **pR** obstruiría a **pcin** y de esta forma reduciría su efecto inhibitorio. No es claro porque los plásmidos **pAPC** que llevan **pcin** pero que carecen de la región **pR-cro'** son estables en **ihf-**; si alguna secuencia de esta región ó de la eliminada de **pBR322** (**HindIII-tetR-AvaI**) se requiere ó simplemente si el tamaño afecta la conformación del DNA en puntos clave como **pcin** ó una secuencia blanco es una cuestión abierta.

Es evidente que la función "normal" de la proteína **IHF**, no es la de reprimir a **pcin** y de hecho aunque se sabe que **IHF** se requiere para la expresión de la proteína **CII**, aparentemente a nivel postranscripcional (ver **Friedman, D.; 1988**), no se conoce con claridad el papel que pueda desempeñar en la región **Y** del fago, sobre todo a nivel de DNA. Una hipótesis atractiva es que **IHF** regula positivamente a **pE**; esta estimulación no sería por interacción directa con el promotor, ya que el sitio al que se une **IHF** se encuentra fuera de **pE** (como en el caso de **pL**); de hecho, esta predicción podría extenderse al menos para **paQ**, otro de los 3 promotores que activa **CII** y que también tiene cerca una caja **IHF** (dentro de **pR'**). Para probar esta hipótesis sería necesario suplir **CII** por una vía que no requiriera de **IHF**.

Por su función y localización **pcin** en cierta forma puede simular el papel de **pE** cuando es activado por **CII** (si bien el efecto de **IHF** sobre ambos podría ser contrario). Cuando la transcripción se inicia de **pE** trae como consecuencia la expresión del gene **cI** (**Reichardt y Kaiser, 1971; Echols y Green, 1971**) y una inhibición parcial tanto de la replicación (**Kourisky y Gros, 1976**)

como de la expresión de los genes tardíos (McMacken et al, 1970; Court et al, 1975). Los efectos inhibitorios son independientes del represor CI y son atenuados con mutaciones en pE (cy); se ha propuesto que estos efectos resultan de la reducción de la actividad de pR por la transcripción convergente de un pE activo, limitando así los niveles de O y P para la replicación y de Q para la expresión de las funciones líticas; de hecho se ha encontrado una reducción de 2 veces en la transcripción que se inicia en pR cuando CII esta presente (Schmeissner et al, 1980). Adicionalmente la expresión del gene Q es inhibida por la transcripción del promotor paQ (que también es activado por CII) probablemente por bloqueo de la traducción de su RNAm por un RNA antisentido (Hoopes y McClure, 1985; Ho y Rosenberg, 1985).

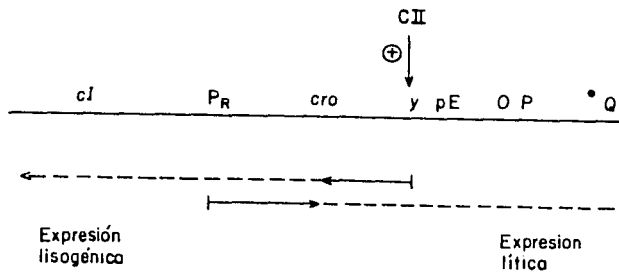
El promotor pcin promueve la transcripción en la misma dirección que pE, y como su actividad es constitutiva, se puede observar el efecto de la transcripción convergente de esta región en condiciones que no requieran de un activador (CII) cuya expresión y actividad esta sujeta a diversos factores. El promotor pcin al igual que pE expresa al gene ci y de acuerdo a las evidencias presentadas en este trabajo, también obstruye a pR. Esta obstrucción puede provocar una reducción en la transcripción que se requiere tanto para la activación del origen (ori) en la replicación como para la expresión de los genes cro, cII, O, P y Q, y como consecuencia afectar las vías donde intervienen estas funciones. La mutación opc1 al incrementar la fuerza de pRoR disminuye la obstrucción de pcin. Es posible que los fagos opc-cin-

expresan más Int que el fago cin- en el ensayo de placa roja debido a una mayor replicación y/o una mayor expresión del gene cII68 que tiene una mutación "leaky".

La obstrucción entre los promotores pR y pcin es simétrica; esto es, se da en ambos sentidos, y además la mutación opc1 al incrementar la fuerza de pR, reduce la obstrucción de pcin. Si se extrapola esta situación a lo que sucede entre pR y pE, se puede predecir que la fuerza de cada promotor dependerá de los niveles de las proteínas que regulan a estos (CI, Cro y CII); así, si el nivel de transcripción de pE es alto y el de pR es bajo, se favorecerá la respuesta lisógena, mientras que si es bajo el nivel de pE y alto el de pR se facilitará la respuesta lítica (ver fig. 21).

La interferencia u obstrucción entre promotores se ha encontrado en otros casos. Inhibición por transcripción convergente se ha observado en el caso de pL y el promotor trp (Ward y Murray, 1979), pero también se ha encontrado interferencia entre promotores adyacentes que transcriben en la misma dirección, como es el caso que se da entre los promotores trp (Hausler y Somerville, 1979), la obstrucción de los promotores gal por pL (Adhya y Gottesman, 1982) y de los promotores P2 y P1 del rRNA de E. coli (Gafny et al, 1994). El mecanismo por el que se efectúa la obstrucción entre los promotores podría ser similar en todos los ejemplos anteriores. Cuando la RNA polimerasa transcribe una molécula de DNA, se genera un superenrollamiento positivo hacia adelante (DNA apretado) y un superenrollamiento negativo hacia atrás (DNA parcialmente desenrollado). En general el superenrollamiento positivo disminuye





**Fig. 21. Transcripción convergente entre los promotores  $pR$  y  $pE$  del fago lambda.** La transcripción del promotor  $pR$  controla la expresión de las funciones líticas, mientras que la transcripción del promotor  $pE$  controla la expresión del gene del represor  $cI$ , que se requiere para la lisogenia. La proteína  $CII$  activa a  $pE$ .

la fuerza de los promotores mientras que el negativo lo incrementa. De este modo, cuando la RNA polimerasa transcribe (hacia adelante) cerca de un promotor, distorsionará su estructura ó conformación y disminuirá su afinidad por la RNA polimerasa (inhibición del inicio de la transcripción). Un modelo menos atractivo es la colisión de polimerasas que se mueven en un mismo sentido ó en sentido opuesto pero en diferentes cadenas (inhibición de la elongación de la transcripción). Existen evidencias de que las proteínas de replicación, que generan la horquilla de replicación, pueden pasar sin colisionar y desplazar a una RNA polimerasa que se mueve en la misma cadena y en la misma dirección (Liu et al, 1993). Por otra parte, cuando los promotores se encuentran demasiado cerca podría darse una interferencia estérica ya que sí un promotor es ocupado con la RNA polimerasa puede impedir el acceso de otra transcriptasa al otro promotor; en cualquier modelo un factor importante es la fuerza de los promotores; en un momento dado, y dependiendo de las condiciones el más fuerte tendrá cierta ventaja sobre el débil. El fenómeno de obstrucción de promotores convergentes parece tener un papel importante en el control temporal de la expresión genética y en especial para la decisión entre la lisis y lisogenia de varios fagos temperados, tales como Mu, 186 y P2 (Krause y Higgins, 1986 y Dodd et al, 1990); así como en la transposición de IS10 (Simons et al, 1983); los resultados del presente trabajo pueden contribuir a esclarecer este tipo de regulación en el bacteriófago lambda.

## CONCLUSIONES

- 1.- Se estableció una diferencia entre los fagos sib+ y sib- en el ensayo de placa roja.
- 2.- Se aislaron 21 mutantes opc con fenotipo Sib- por medio del ensayo de placa roja.
- 3.- Las mutaciones opc revierten el efecto de cin1 en fagos y plásmidos en cepas ihf-.
- 4.- La mutación opc disminuye la eficiencia de lisogenia de los fagos cin-.
- 5.- La mutación opc incrementa ligeramente la eficiencia de integración de los fagos cin-.
- 6.- La mutación opc aumenta la interferencia de los plásmidos (pR-ori) sobre el desarrollo de los fagos imm434; mientras que la mutación cin la disminuye.
- 7.- La mutación opc reduce la susceptibilidad de los fagos a la interferencia de los plásmidos (tR1-ori); mientras que la mutación cin la incrementa.
- 8.- Mediante el mapeo genético y de restricción, la mutación opc1 se localizó en la región pR-cro'.
- 9.- La actividad del promotor pR con la mutación opc1 resultó menor que la del promotor silvestre

## PERSPECTIVAS

Para demostrar el incremento en la fuerza del promotor **pRoR** y la obstrucción simétrica entre los promotores **pR** y **pcin**, se podrían explorar con más detalle las siguientes cuestiones:

- 1.- El cambio de bases que provocó la mutación opcl. De hecho de esta forma se podría conocer si las otras mutaciones opc son diferentes entre si.
- 2.- Los niveles de transcripción que se generan a partir de **pR** (con y sin opc) y de **pcin** (por separado y entre ellos). La obstrucción de un promotor sobre otro provocaría una reducción en la transcripción.
- 3.- La síntesis del DNA viral de mutantes opc-. La predicción es que la replicación de fagos cin-opc- es mayor que la de fagos cin-.
- 4.- La tasa de eclosión de fagos cin- con y sin las mutaciones opc- y Pam (ambar) a bajas multiplicidades de infección. **pcin** podría aumentarla; mientras que opc disminuirla.

## REFERENCIAS

- Abraham, J., Mascarenhas, D., Fischer, R., Benedik, M., Campbell, A. y Echols, H. (1980). DNA sequence of the regulatory region for the integration gene of bacteriophage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 2477.
- Adhya, S. y Gottesman, M. (1982). Promoter Occlusion: Transcription through a promoter may inhibit its activity. Cell. 29: 939.
- Berg, D.E. y Kellenberger, G. (1974). N protein causes the  $\lambda$ dv plasmid to inhibit heteroimmune phage imm434 growth and stimulates  $\lambda$ dv replication. Virology. 62: 234.
- Belfort, M. y Wulff, D. L. (1973 a). Genetic and biochemical investigation of the *Escherichia coli* mutant hfl-1 which is lysogenized at high frequency by bacteriophage lambda. J. Bacteriol. 115: 299.
- Belfort, M. y Wulff, D. L. (1973 b). An analysis of the processes of infection and induction of *E. coli* hfl-1 by bacteriophage lambda. Virology. 55: 183.
- Belfort, M. y Wulff, D. L. (1974). The roles of lambda cIII gene and the *Escherichia coli* catabolite gene activation system in the establishment of lysogeny by bacteriophage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 779.
- Belfort, M., Noff, D. y Oppenheim, A. B. (1975). Isolation, characterization deletion mapping of amber mutation in the cII gene of phage  $\lambda$ . Virology 63: 147.

- Campbell, A. M. (1961). Sensitive mutants of bacteriophage lambda. *Virology* 14: 22.
- Campbell, A.M. (1962). Episomes. *Adv. Genet.* 11: 101.
- Claverie-Martin, F. y Magasanik, B. (1992). Positive and negative effects of DNA bending on activation of transcription from a distant site. *J. Mol. Biol.* 227: 996.
- Court, D., Green, L. y Echols, H. (1975). Positive and negative regulation by the  $\phi$ II and  $\phi$ III gene products of bacteriophage lambda. *Virology* 63: 484.
- Court, D., Brady, C., Rosenberg, M., Wulff, D., Behr, Mahoney, M. e Izumi Steven. (1980). Control of transcription termination: A rho-dependent termination site in bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 138: 231.
- Dodd, I., Kalionis, B. y Egan, B. (1990). Control of gene expression in the temperate coliphage 186. VIII. Control of Lysis and Lysogeny by a transcriptional switch involving face-to-face promoters. *J. Mol. Biol.* 214: 27.
- Echols, H. y Green, L. (1971). Establishment and maintenance of repression by bacteriophage lambda: The role of the  $\phi$ I,  $\phi$ II and  $\phi$ III proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68: 2190.
- Echols, H. y Guarneros, G. (1983). Control of integration and excision. en *Lambda II*. Hendrix  $\phi$  a1, eds. pp. 75. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Enquist, L.W. y Weisberg, R.A. (1976). The red plaque test: a rapid method for identification of excision defective variants of bacteriophage lambda. *Virology.* 72: 147.

- Feiss, M., Adhya, S. y Court, D. (1972). Isolation of a plaque forming, galactose transducing strain of phage lambda. *Genetics*. 71: 189.
- Flashman, S.M. (1978). Mutational analysis of the operators of bacteriophage lambda. *Molec. Gen. Genet.* 166: 61.
- Fowler, R., Degnen, G. y Cox, E. (1974). Mutational specificity of a conditional *Escherichia coli* mutator *mut5*. *Mol. Gen. Genet.* 133: 179.
- Friedman, D.I. (1988). Integration Host Factor: A protein for all reasons. *Cell*. 55: 545.
- Friedman, D.I. y Gottesman, M. (1983). Lytic mode of lambda development. en *Lambda II*. Hendrix *et al*, eds. pp. 21. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harborg, New York.
- Gafny, R., Cohen, S., Nachaliel, N. y Glaser, G. (1994). Isolated P2 rRNA promoters of *E. coli* are strong promoters that are subje<sup>t</sup> to stringent control. *J. Mol. Biol.* 243(2): 152.
- Giladi, H., Gottesman, M. y Oppenheim, A. (1990). Integration Host Factor stimulates the phage lambda pL promoter. *J. Mol. Biol.* 213: 109.
- Gingery, R. y Echols, H. (1967). Mutants of bacteriophage lambda unable to integrate into the host chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58: 1507.
- Gottesman, M. y Yarmolinsky, M. (1968). Integration-negative mutants of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 31: 487.
- Griffo, G., Oppenheim, A. y Gottesman, M. (1989). Repression of the  $\lambda$ pcin promoter by Integrative Host Factor.

- J. Mol. Biol. 209: 55.
- Grozicker, T., Arditti, R. y Eisen, H. (1972). Establishment of repression by lambdoid phage in catabolite activator protein and adenylate cyclase mutants of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69: 366.
- Guarneros, G. y Echols, H. (1970). New mutants of bacteriophage with a specific defect in excision from the host chromosome. J. Mol. Biol. 47: 565.
- Guarneros, G. y Galindo, J.M. (1979). The regulation of integrative recombination by the b2 region and the cII gene of bacteriophage  $\lambda$ . Virology. 95: 119.
- Guarneros, G., Montañez, C., Hernandez, T. y Court, D. (1982). Posttranscriptional control of bacteriophage  $\lambda$  int gene expression from a site distal to the gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 238.
- Gussin, G., Matz, K. y Wulff, D. (1980). Suppression of pRM-mutations by cin1, a mutation creating a new promoter for leftward transcription of the cI gene. Virology. 103: 465.
- Hausler, B. y Somerville, R. (1979). Interaction *in Vivo* between strong closely spaced constitutive promoters. J. Mol. Biol. 127: 353.
- Herkowitz, I. y Hager, D. (1980). The Lysis-Lysogeny decision of phage  $\lambda$ : Explicit programming and responsiveness. Annu. Rev. Genet. 14: 399.
- Ho, Y. y Rosenberg, M. (1982). Characterization of the phage regulatory protein cII. Annu. Microbiol. (Paris) 133A: 215.



- Ho, Y. y Rosenberg, M. (1985). Characterization of a third, cII-dependent, coordinately activated promoter on phage  $\lambda$  involved in lysogenic development. *J. Biol. Chem.* 260: 11838.
- Hoess, R., Foeller, C., Bidwell, K. y Landy, A. (1980). Site specific recombination functions of bacteriophage  $\lambda$ : DNA sequence of the regulatory regions and overlapping structural genes for *Int* and *Xis*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 2482.
- Hoopes, B. y McClure, W. (1985). A cII-dependent promoter is located within the *Q* gene of bacteriophage  $\lambda$ .  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 3134.
- Hoyt, M., Knight, D., Das, A., Miller, H. y Echols, H. (1982). Control of phage development by stability and synthesis of cII protein: Role of the viral *cIII* and host *hflA*, *himA*, and *himD* genes. *Cell.* 31: 565.
- Jones, M., Fischer, R., Herkowitz, I. y Echols, H. (1979). Location of the regulatory site for establishment of repression of bacteriophage  $\lambda$ .  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 150.
- Kaiser, A. D. y Jacob, F. (1957). Recombination between related temperate bacteriophages and the genetic control of immunity and prophage localization. *Virology* 4: 509.
- Kaiser, A. y Masuda, T. (1970). Evidence for a prophage excision gene in  $\lambda$ . *J. Mol. Biol.* 47: 557.
- Katzir, N., Oppenheim, A., Belfort, M. y Oppenheim, A.B. (1976). Activation of the lambda *int* gene by the *cII* and *cIII* gene

- products. *Virology* 74: 324.
- Kellenberg, G., Zichichi, M. L. y Weigle, J. (1961). Exchange of DNA in the recombination of bacteriophage  $\lambda$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 57: 869.
- Kikuchi, A., Flamm, E. y Weisberg, R. (1985). An *Escherichia coli* mutant unable to support site specific recombination of bacteriophage  $\lambda$ . *J. Mol. Biol.* 183: 129.
- Kourilsky, P. (1973). Lysogenization by bacteriophage lambda. I. Multiple infection and the lysogenic response. *Mol. Gen. Genet.* 122: 183.
- Kourilsky, P. y Gros, D. (1976). Lysogenization by bacteriophage lambda. IV. Inhibition of phage DNA synthesis by the products of genes cII and cIII. *Biochimie* 58: 1321.
- Krause, H. e Higgins, N. (1986). Positive and negative regulation of the Mu operator by Mu represor and *Escherichia coli* Integration Host Factor. *J. Biol. Chem.* 261: 3744.
- Kur, J., Hasan, N. y Szybalski W. (1990). Alterations in the pR' promoter of coliphage  $\lambda$  modify both its activity and interaction with the integration host factor (IHF). *Mol. Gen. Genet.* 221: 411.
- Liedke-Kulke, M. y Kaiser, A. D. (1967). Genetic control of phage insertion specificity in bacteriophage  $\lambda$  and 21. *Virology* 32: 465.
- Liu, B., Wong, M.L., Tinker, R.L., Geiduschek, E. P. y Alberts, B.M. (1993). The DNA replication fork can pass RNA polymerase without displacing the nascent transcript.

- Nature 366: 33.
- Manly, K., Signer, K. y Radding, C. (1969). Virology 37: 177.
- Matsubara, K. (1972). Interference in phage growth by a resident plasmid dv. I. The mode of interference. Virology. 50: 713.
- Matsubara, K. (1974). Interference in bacteriophage growth by a resident plasmid  $\lambda$ dv. II. Role of the promoter-operator. J. Virol. 13: 603.
- Matsubara, K. (1981). Replication Control System in Lambda dv. Plasmid. 5: 32.
- Matsubara, K. y Otsuji, Y. (1978). Preparation of plasmids from lambdoid phages and studies on their incompatibilities. Plasmid. 1: 284.
- Mengeritsky, G., Goldenberg, D., Mendelson, I., Giladi, H. y Oppenheim, A. (1993). Genetic and biochemical analysis of the Integration Host Factor of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 231: 646.
- McDermitt, M., Pierce, M., Staley, D., Shimaji, M., Shaw, R. y Wulff, D. (1976). Mutations masking the lambda cin1 mutation. Genetics 82: 417.
- McMaken, R., Mantei, N., Butler, B., Joyner, A. y Echols, H. (1970). Effect of mutation in the cII and cIII genes of bacteriophage  $\lambda$  on macromolecular synthesis in infected cells. J. Mol. Biol. 49: 639.
- McKenney, K., Shimatake, H. (1981) A system to study promoter and terminator signals recognized by Escherichia coli RNA polymerase. En Gene Amplification an Analysis. Vol 2.

- pp. 384. Eds. Chirikja y Papas. Elsevier North Hollands.
- Meyer, B., Maurer, R. y Ptashne M. (1980). Gene regulation at the right operator (oR) of bacteriophage  $\lambda$ . II. oR1, oR2 y oR3: Their roles in mediating the effects of repressor and cro. J. Mol. Biol. 139: 163.
- Miller, H.I. y Friedman, D. (1980). An Escherichia coli gene product required for lambda site-specific recombination. Cell. 20: 711.
- Miller, H.I., Mozola, M. y Friedman, D. (1980). int: An int mutation of phage  $\lambda$  that enhances site-specific recombination. Cell. 20: 711.
- Miller, H.I. y Nash, H. (1981). Direct role of the himA gene product in phage  $\lambda$  integration. Nature 290: 523.
- Miller, H.I., Abraham, J., Benedik, M., Campbell, A., Court, D., Echols, H., Fischer, R., Galindo, J.M., Guarneros, G., Hernandez, T., Mascarenhas, D., Montañez, C., Schindler, D., Schmeissner, V. y Sosa, L. (1981). Regulation of the integration-excision by bacteriophage  $\lambda$ . Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45: 439.
- Miller, H.I. (1981). Multilevel regulation of bacteriophage  $\lambda$  lysogeny by the E. coli himA gene. Cell. 25: 269.
- Montañez, C., Bueno, J., Schmeissner, U., Court, D. y Guarneros, G. (1986). Mutations of bacteriophage lambda that define independent but overlapping RNA processing and transcription termination sites. J. Mol. Biol. 191: 29.
- Murotsu, T. y Matsubara, K. (1980). Role of an autorepression

- system in the control of  $\lambda$ dv plasmid copy number and incompatibility. Molec. Gen. Genet. 179: 509.
- Ogura, T., Niki, H., Kano, Y., Imamoto, F. y Hiraga, S. (1990). Maintenance of plasmids in Hu and IHF mutants of Escherichia coli. Molec. Gen. Genet. 220: 197.
- Ortega, J.P. (1983). Efecto del regulador distal sib sobre la recombinación escisiva del bacteriófago lambda. Tesis magisterial. CINVESTAV, México, D.F.
- Ptashne, M., Jeffrey, A., Johnson, A., Maurer, R., Meyer, B., Pabo, C., Roberts, T. y Saurer, R. (1980). How the  $\lambda$ repressor and cro work. Cell. 19:1.
- Reichardt, L. y Kaiser, A. (1971). Control of repressor  $\lambda$  synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 68: 2185.
- Rosenberg, M., Court, D., Shimatake, H., Brady, C. y Wulff, D. (1978). The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in phage  $\lambda$ . Nature 272: 414.
- Simons, R., Hoopes, B., McClure, W. y Kleckner, N. (1983). Three promoters near the termini of IS10: pIn, pOUT, and pIII. Cell. 34: 673.
- Schindler, D. y Echols, H. (1981). Retroregulation of the int gene of bacteriophage  $\lambda$ : Control of transnational completion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 4475.
- Schmeissner, U., Court, D., Shimatake, H. y Rosenberg, M. (1980). Promoter for the establishment of repressor synthesis in bacteriophage  $\lambda$ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 3191.

- Shulman, M. J., Hallick, L. M., Echols, H. y Signer, E. R. (1970).  
Properties of recombination-deficient mutants of  
bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 52: 501.
- Signer, E. R. y Weil, J. (1968). Recombination in bacteriophage  $\lambda$ .  
I. Mutants deficient in general recombination.  
J. Mol. Biol. 34: 261.
- Signer, E. R., Echols, H., Weil, J., Radding, C. M., Schulman, M.  
Moore, L. y Manly, K. (1969). The general recombination  
system of bacteriophage  $\lambda$ . Cold Spring Harbor Symp.  
Quant. Biol. 33: 711.
- Sussman, R. y Jacob, F. (1962). Sur un système de répression  
thermosensible chez le bactériophage d' Escherichia coli.  
C. R. Acad. Sci. 254: 1517.
- Ward, D. y Murray, N. (1979). Convergent transcription in  
bacteriophage  $\lambda$ : Interference with gene expression.  
J. Mol. Biol. 133: 249.
- Williams, J., Wulff, D. y Nash, H. (1977). A mutant of  
Escherichia coli deficient in a host function required for  
phage lambda integration and excision. En DNA insertion  
elements, plasmids, and episomes. Bukhari, A. et al, eds.  
pp. 357. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,  
New York.
- Wulff, D. (1976). Lambda cin1, a new mutation wich enhances  
lysogenization by bacteriophage lambda and the genetic  
structure of the lambda cY region. Genetics 82: 401.
- Wulff, D., Beher, M., Izumi, S., Beck., J., Mahoney, M.,

Shimatake, H., Brady, C., Court, D. y Rosenberg, M. (1980).

Structure and function of the  $c_{\lambda}$  control region of  
bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 138: 209.

Zissler, J. (1967). Integration negative (int) mutants of phage  $\lambda$ .  
Virology 31: 189.