

VCH-FC
M46-B
M385

LOCALIZACION DE DOS MUTACIONES TERMOSENSIBLES EN
REPLICACION DEL BACTERIOFAGO PM2 EN EL
MAPA FISICO VIRAL

Tesis
presentada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas
con mención en Genética

Facultad de Ciencias

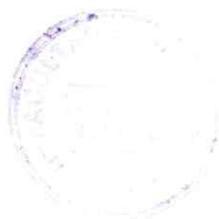
por

Jessica Isabel Martínez Arenas

1992

Director de Tesis:

Dra. Eliana Canelo S.
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la Candidata

JESSICA ISABEL MARTINEZ ARENAS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética.

Director de Tesis
Dra. Eliana Canelo S.

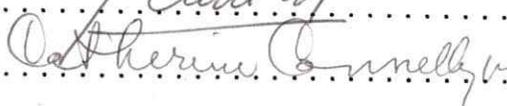

.....

Comisión Informante de Tesis

Dra. Margarita Carù


.....

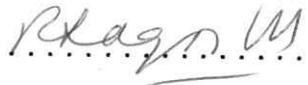
Dra. Catherine Conelly


.....

Dr. Romilio Espejo

.....

Dra. Rosa Alba Lagos


.....

A mis padres y hermanos
A Juan Luis

AGRADECIMIENTOS

De todo corazón a mis padres y hermanos, por su constante preocupación, apoyo y estímulos en los momentos difíciles. Sin ellos no lo hubiera logrado.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Eliana Canelo por su amistad, dedicación y sabios consejos, sin los cuales se hubiera tornado difícil sacar esta tarea.

En especial a Juan Luis Toledo por estar conmigo en cada momento, contar con todo su apoyo e impulsarme a seguir adelante. Además por contribuir experimentalmente en el desarrollo de esta tesis al subclonar el fragmento PstI-AvaI de 7,5 Kb del mutante ts79.

A mi gran amiga Blanca Urzúa quien, a lo largo de estos años, siempre tuvo la disposición para escucharme y ayudarme.

Al Dr. Victor Cifuentes por su amistad y generoso aporte e interés en el desarrollo de esta tesis.

Al profesor Fernando Zambrano por su constante preocupación y ayuda en el desarrollo y corrección de esta tesis.

A la Dra. Rosa Alba Lagos por estar siempre llana a escucharme y contar con su sincero apoyo en todo aquello que quise emprender.

A Ruben León por su sincera amistad y por haber clonado el genoma total del mutante ts79.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Fisiología de Membranas (Mireya, Tulio, Vicky, Manuel y Mauricio) por su ayuda , afecto y amistad.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética que siempre me brindaron su incondicional apoyo y amistad.

El ser acreedora del Concurso DTI 1991 para financiamiento de Tesis de Postgrado, significó un aporte material de gran ayuda para el desarrollo de esta investigación.

Finalmente gracias a todas las personas que han contribuido al esfuerzo exigido en la elaboración de esta tesis ya sea directa o indirectamente.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Eliana Canelo en el Laboratorio de Fisiología de Membranas del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y fue financiada por los siguientes proyectos: B3043-9012, B30433-9222 y 91-033 del Departamento Técnico de Investigación de la Universidad de Chile.

INDICE DE MATERIAS

	Pág
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE MATERIAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCION	
1.1 Antecedentes bibliográficos	1
II. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Medios de cultivo	9
2.2 Soluciones	10
2.2.1 Soluciones en preparación de DNA plasmidial	10
2.2.2 Soluciones para reacciones enzimáticas	10
2.3 Tampones	11
2.4 Antibióticos	11
2.5 Enzimas y DNAs	11
2.6 Cepas bacterianas	12
2.7 Bacteriófagos	12
2.8 Cultivos bacterianos	12

2.9	Suspensión de PM2	13
2.10	Purificación de PM2	13
2.11	Cuantificación del bacteriófago	14
2.12	Preparación del DNA de PM2	14
2.13	Preparación de DNA plasmidial	
	a) en pequeña escala	16
	b) en gran escala	17
2.14	Infección de esferoplastos de BAL31 con DNA purificado de PM2	18
2.15	Detección de DNA viral intracelular	19
2.16	Electroforesis en gel de agarosa	
	a) agarosa tipo II	19
	b) agarosa de bajo punto de fusión	20
2.17	Extracción del DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión	20
2.18	Reacciones enzimáticas	
	a) reacción de restricción	20
	b) reacción de ligamiento	21
2.19	Construcción de genomas virales hibridos entre fragmentos del DNA de PM2 silvestre y mutantes	21
2.20	Preparación de bacterias <i>E. coli</i> competentes	22
2.21	Transformación de <i>E. coli</i>	22

III. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

3.1	Clonamiento del DNA de PM2 mutante ts79	24
3.2	Clonamiento del fragmento de 2.5 Kb del DNA de PM2 ts71 y ts79	27
3.3	Subclonamiento del fragmento de 7.5 Kb PstI-AvaI del DNA de PM2 ts79	31
3.4	Determinación de la infectividad de genoma viral recuperado de plasmido híbrido	33
3.5	Detección de DNA viral intracelular	35
3.6	Acotación de la ubicación de la mutación ts en replicación del bacteriófago PM2	44
3.7	Construcción de genomas virales híbridos entre fragmentos ts y wt Sau 96I del DNA de PM2	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Pág
1.	Esquema de los diferentes componentes estructurales del bacteriófago PM2	2
2.	Modelo de replicación via círculo rotatorio del bacteriófago ØX174	4
3.	Mapas de restricción de PM2	7
4.	Estrategia de clonamiento del genoma total de PM2	25
5.	Análisis electrforético del inserto del plásmido recombinante pPMts79	26
6.	Esquema del plásmido recombinante con inserto viral de 2.5 Kb	29
7.	Análisis electroforético del plásmido recombinante pPMts1	30
8.	Subclonamiento del fragmento PstI-AvaI de 7.5 Kb del DNA de PM2 ts79	32
9.	Análisis electroforético del subclon pPMts11 que lleva inserto el fragmento PstI-AvaI de 7.5 Kb del mutante ts79	34
10.	Esquema de la estrategia utilizada en la construcción de los genomas virales híbridos entre fragmentos PstI-AvaI	36

11. Análisis electroforético de los fragmentos PstI-AvaI del DNA de PM2 recuperados de un gel de bajo punto de fusión 37
12. Análisis electroforético de la mezcla de fragmentos PstI-AvaI mutantes y silvestre de PM2 tratada con DNA ligasa de T4 39
13. Análisis electroforético del DNA viral sintetizado a 30°C por fagos con DNA híbridos 43
14. Análisis electroforético de los fragmentos Sau 96I del DNA de PM2 recuperados de un gel de bajo punto de fusión 46
15. Construcción de genomas virales híbridos entre fragmentos Sau 96I 47
16. Análisis electroforético de la mezcla de fragmentos Sau 96I mutantes y silvestre de PM2 tratada con DNA ligasa de T4 48
17. Análisis electroforético del DNA viral sintetizado a 30°C por fagos con DNA híbridos 51

LISTA DE TABLAS

TABLA		Pág
1.	Análisis fenotípico de placas de lisis obtenidas por transfección con genomas virales híbridos PstI-AvaI	41
2.	Análisis fenotípico de placas de lisis obtenidas por transfección con genomas virales híbridos Sau 96I	49

ABREVIATURAS

Ap	:	ampicilina
ATP	:	adenosina trifosfato
BrEt	:	bromuro de etidio
BSA	:	albúmina de suero de bovino
Cn	:	Cloranfenicol
DO	:	densidad óptica
DTT	:	ditiotreitól
EDTA	:	ácido etilendiamino tetraacético
IPTG	:	isopropil tiogalactosido
Kb	:	kilobases
LB	:	Luria Broth
m.d.i	:	multiplicidad de infección
pb	:	pares de bases
PEG	:	polietilenglicol
PM	:	peso molecular
SDS	:	dodecil sulfato de sodio
u.f.p	:	unidades formadoras de placas
UV	:	ultravioleta
X-gal	:	5-bromo-4 cloro 3 indolil -D galacto piranosido

RESUMEN

El genoma del bacteriófago PM2 está constituido de una molécula de DNA circular, doble hebra, sobreenrollada de 10,2 Kb que se postula replica por el modelo de círculo rotatorio, descrito en otros sistemas tales como fagos de DNA simple hebra ϕ X 174, fd ,M13 y también en plásmidos de DNA doble hebra como pT181. En PM2 el sistema de replicación no es bien conocido y por las características de su genoma constituye un buen sistema para estudiar la replicación del DNA basadas en el modelo propuesto.

En los diferentes sistemas mencionados que replican bajo este modelo se ha demostrado que participa una endonucleasa específica para el sitio ori, la que está codificada en un segmento de DNA sobrepuesto al sitio de origen de replicación o muy cercano a este. En PM2 el sitio ori ha sido ubicado en el fragmento Hind III-4 del mapa físico viral.

Como una manera de caracterizar el sistema de replicación de PM2 nos propusimos determinar la ubicación del gen de replicación mediante la localización en el mapa físico viral de dos mutaciones termosensibles en replicación del DNA. Para tal efecto, mediante técnicas de DNA recombinante, se construyeron genomas virales híbridos entre segmentos PstI-AvaI de DNA de PM2 silvestre y mutante y después de transfección de la bacteria huésped *A. espejiana* BAL31, se encontró que la progenie viral era

defectiva en replicación de DNA viral cuando los genomas infectantes estaban constituidos por los fragmentos PstI-AvaI de 7,5 Kb ts y 2,5 Kb silvestre. Se verificó que la función de síntesis de DNA viral estaba alterada en la progenie obtenida post transfección.

De ahí que nuestros resultados localizan el gen de replicación del bacteriófago PM2 en el segmento de PstI-AvaI de 7,5 Kb en el mapa físico viral.

Posteriormente se acotó la ubicación de dichas mutaciones, específicamente en qué porción del fragmento PstI-AvaI de 7,5 Kb se encontraban. Para lograrlo se optó por construir genomas virales híbridos entre fragmentos Sau96I de 3,6 Kb y 6,9 Kb. Con los genomas virales híbridos Sau 96I se transfectó BAL31 y se encontró que el fenotipo ts en replicación de DNA se presentaba cuando el genoma de la progenie viral había recibido el fragmento Sau 96I de 3,6 Kb ts.

Los resultados obtenidos indican que las dos mutaciones termosensibles en replicación del bacteriófago PM2 en el fragmento Sau 96I de 3,6 Kb, distante del origen de replicación viral.

ABSTRACT

The genome of the bacteriophage PM2 is a closed double-stranded supercoiled DNA molecule with a molecular weight of six million. It replicates by the rolling circular model, previously described for other systems such as ϕ X174, fd, M13 and double-stranded DNA plasmid such as pT181. The PM2 replication system is little known, and due to the genome characteristics it is a good system to study the replication of DNA.

In the different systems that replicate following this model, a specific ori-site endonuclease participates that is codificated in a fragment next to the origin site or overlapping it. The ori-site in PM2 is located in the Hind III-4 fragment of the viral physical map.

To characterize the PM2 replication system we decided to determine the position of the replication gene through the localization of two thermosensible mutations of DNA replication in the physical viral map. For this, we used DNA recombination techniques, and built hybrid viral genomes between PstI-AvaI fragments of wild type and mutant PM2 DNA. By transfection of the host bacterium *A. espejiana* BAL31, we found that the viral progeny was defective in DNA replication when the infectant genome was composed by PstI-AvaI fragment of 7.5 Kb ts and 2.5 Kb wt.

Futhermore, we verified that the progeny obtained post transfection were defective in viral DNA synthesis.

Therefore, our results localize the replication gene of bacteriophage PM2 in the PstI-AvaI fragment of 7.5 Kb.

Then, we circumscribed the localization of the mutations, specifically defining in which portion of the PstI-AvaI fragment they were found. Viral hybrid genomes were constructed between 3.6 Kb and 6.9 Kb Sau 96I fragments. When BAL31 cells were transfected with these viral hybrid genomes, it was found that the ts phenotype in DNA replication was present when the genome of viral progeny had the 3.6 Kb ts fragment.

The results obtained indicate that the two ts mutations in DNA replication of bacteriophage PM2 are located in the 3.6 Kb Sau 96I fragment, far from of the viral replication origin.

I. INTRODUCCION

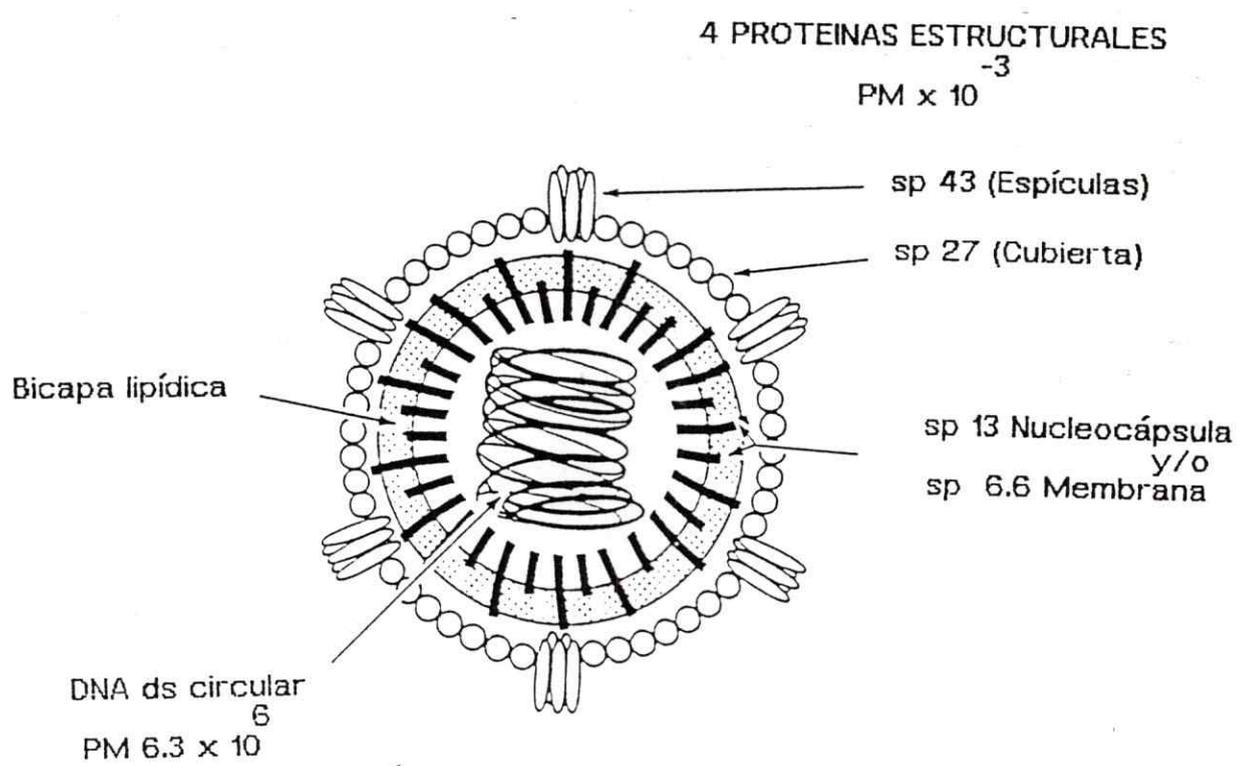
1.1 Antecedentes bibliográficos

Nuestro sistema de estudio es el formado por el bacteriófago PM2 y su bacteria huésped *Alteromonas espejiana* BAL 31, aislados en 1968 de agua de mar en la Costa Central de Chile (11,12). Esta es una bacteria marina gram negativa que se caracteriza por poseer un sólo flagelo polar y cuya temperatura óptima de crecimiento oscila entre 28°C y 30°C.

Por otra parte el bacteriófago PM2 es un virus icosaédrico cuyos componentes estructurales son, una proteína de 46 KDa que forma las espículas del virión, una proteína de 26 Kda que forma la cubierta de la partícula viral, y más al interior una bicapa de fosfolípidos que rodea la nucleocápsula, que a su vez está constituida por dos proteínas, una de 12,5 KDa relacionada con la bicapa lipídica y la otra de 6,6 KDa, que está relacionada con el DNA viral. (Figura 1). El genoma de PM2 corresponde a una molécula de DNA circular de doble hebra sobreenrollada (13) con aproximadamente 50 vueltas supernumerarias que pesa $6,6 \times 10^6$ Da.

Con respecto al sistema de replicación de PM2 los antecedentes que se tienen hasta el momento son los siguientes:

- A tiempos tardíos en la infección con el fago silvestre se ha demostrado la existencia de dos intermediarios precursores del DNA viral maduro, uno de ellos corresponde a una molécula de DNA doble hebra circular relajada cuyo coeficiente de sedimentación



Capacidad codificante 315,000 daltones
8-12 Genes

Proteínas estructurales = 90,000

FIGURA 1: Estructura esquemática del bacteriófago PM2. Se muestra el DNA, la membrana correspondiente a una bicapa lipídica y las cuatro proteínas estructurales (7).

sp = proteína estructural

es de 21 S. El otro intermediario es una molécula de DNA de doble hebra circular relajado que posee un brazo de doble hebra cuya longitud variable nunca es mayor que el largo del genoma total, que tiene un coeficiente de sedimentación de 24 S y que corresponde al genoma viral en replicación. Este intermediario adquiere relevancia puesto que ha permitido postular que la replicación del bacteriófago se realizaría mediante un mecanismo de círculo rotatorio (14).

El modelo de replicación vía círculo rotatorio, de acuerdo a lo ya descrito para el bacteriófago ϕ X 174 cuyo genoma corresponde a una molécula de DNA circular simple hebra, la cual se ha denominado hebra positiva(+) **Figura 2**, se caracteriza porque al infectar su bacteria huésped adquiere una hebra complementaria negativa (-) que le permite adoptar una conformación de DNA circular doble hebra sobreenrollado denominada forma replicativa I (RFI). Para que se inicie el evento replicativo es necesaria la conversión del RFI en DNA doble hebra circular relajado, forma replicativa II (RFII). En esta conversión interviene una endonucleasa específica para el sitio ori de replicación que es codificada por el fago. Esta enzima cliva la hebra (+) de la molécula relajándola y generando un extremo 3'OH libre. A partir de este extremo 3'OH libre comienza la síntesis de una nueva hebra (+), al mismo tiempo el otro extremo de la hebra comienza a ser desplazado y la hebra simple estabilizada por proteínas de unión al DNA. Una vez que la nueva hebra sintetizada alcanza el sitio de origen, la misma

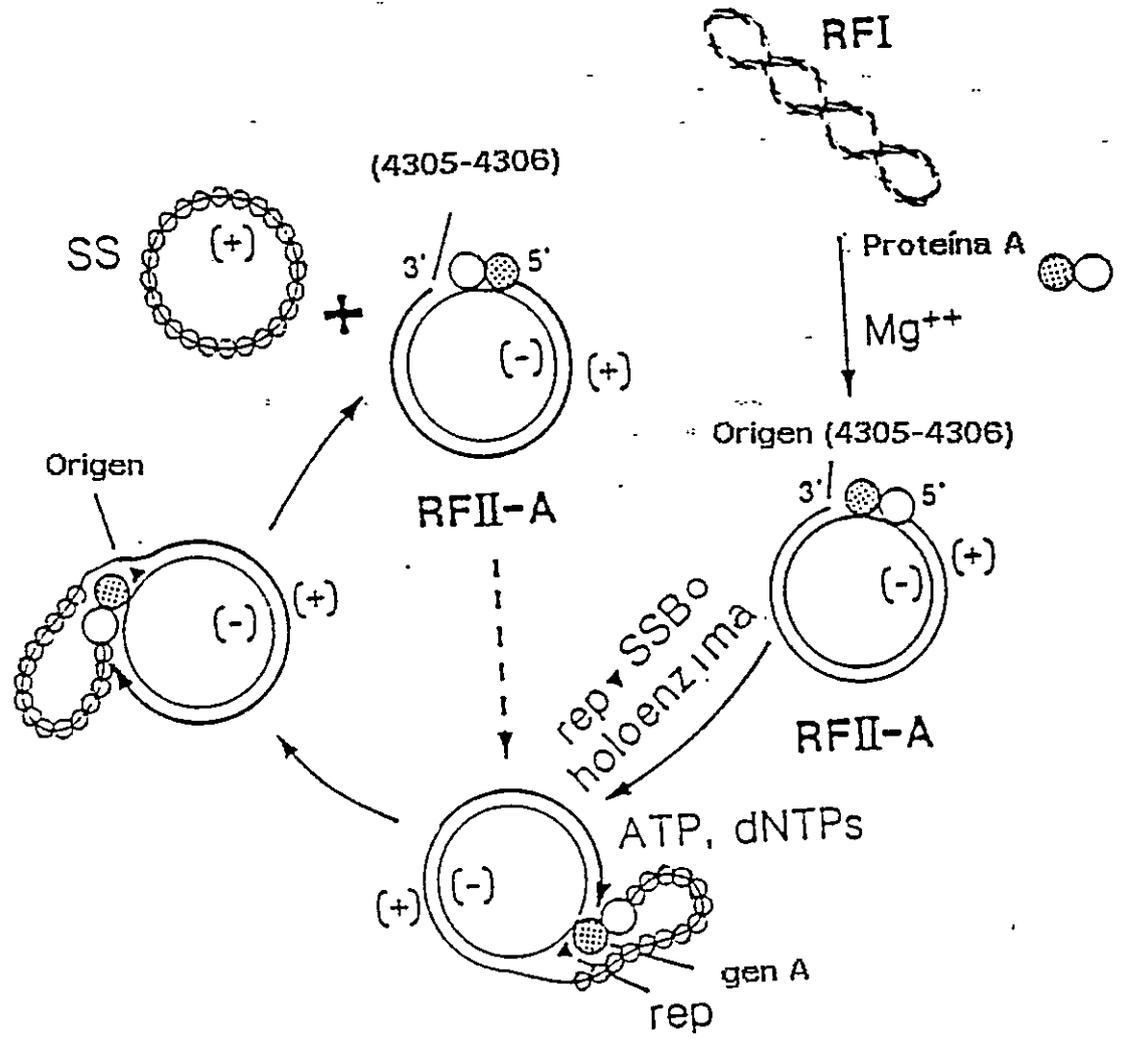


FIGURA 2: Modelo de replicación vía círculo rotatorio del DNA del bacteriófago ØX174 (3)

endonucleasa sitio ori-específica provoca un nuevo corte que genera un DNA de simple hebra circular similar al original y otra molécula RFII que reinicia el ciclo. En este fago el origen de replicación se ubica dentro del segmento de DNA viral que codifica la endonucleasa sitio ori-específica, proteína A (16,19). Esta estrecha relación espacial entre sitio origen y proteína específica se ha encontrado en otros sistemas que usan el mismo mecanismo de replicación, como por ejemplo : fagos filamentosos como fd en que el sitio ori se encuentra en una región inmediatamente adyacente al gen que codifica la endonucleasa sitio ori-específica (3, 27, 28), y plásmido pT181 cuyo ori se encuentra dentro de la secuencia que codifica la endonucleasa específica, Rep C (19, 20, 24).

Mediante análisis bioquímico se han logrado identificar en PM2 algunos mutantes termosensibles (ts) en replicación (8). Estudios genéticos a partir de una colección de mutantes termosensibles de PM2 permitieron determinar la existencia de cinco grupos de complementación o cistrones y ubicar las mutaciones en un mapa genético parcial (1). Se ha demostrado también que mutantes en el cistron I del fago producen, en condiciones permisivas (20°C) viriones infectivos con algunas propiedades alteradas como estabilidad térmica y rango de huésped, lo cual podría ser atribuible a cambios en proteínas estructurales (8). En el cistron IV, mediante electroforesis se identificaron dos mutantes ts en los cuales las bandas de DNA

viral en células infectadas con estos mutantes en condiciones restrictivas (30°C), eran escasamente visibles al compararlas con aquellas observadas en una infección utilizando el fago silvestre. Esto sugiere que dicho cistrón codifica una función de replicación del DNA viral (8). Además del mapa genético parcial antes mencionado, el uso de enzimas de restricción ha permitido la confección de un detallado mapa físico de PM2 (2). Por otra parte, mediante marcación radiactiva del DNA viral en replicación y posterior análisis de la distribución de la marca, se determinó que el sitio ori de replicación se encontraba en el fragmento HindIII-4 (Figura 3)(1, 36).

Es importante mencionar que todo lo descrito para la replicación tipo círculo rotatorio se refiere a fagos con DNA de simple hebra y a plásmidos de la familia de pT181 que, teniendo genoma de DNA de doble hebra, generan y acumulan inicialmente círculos de una hebra. Como en PM2 no se han descrito intermediarios de una hebra y el precursor de 24S muestra claramente un brazo de doble hebra en toda su extensión, este genoma constituye un sistema único para estudiar el modelo en DNA de doble hebra. Todo esto ha motivado que nuestro laboratorio esté interesado en caracterizar el sistema de replicación del bacteriófago PM2 y nos preguntamos si esta estrecha relación espacial descrita entre proteína iniciadora y sitio ori puede ser postulada para PM2. Se consideró que una manera de ayudar a esclarecer el proceso de replicación de PM2 era determinando la localización de las dos mutaciones termosensibles en replicación

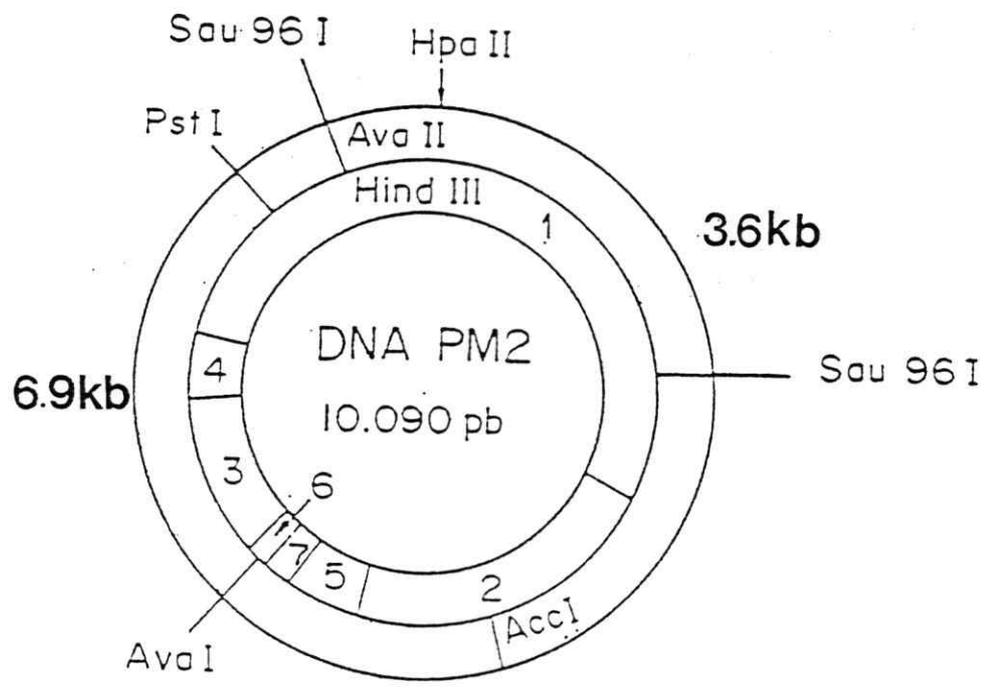


FIGURA 3: Mapa de Restricción de PM2
Se muestran los sitios de restricción más relevantes a la investigación propuesta.

del bacteriófago PM2.

Se utilizaron los dos mutantes ts en replicación de PM2 que mapean en el cistrón IV: PM2 ts71 y PM2 ts79 (8). Como estrategia experimental tendiente a resolver la problemática expuesta se propuso la construcción de genomas virales híbridos entre segmentos del DNA de PM2 silvestre y mutante generados por las enzimas de restricción PstI y AvaI (Figura 3), y el análisis posterior del fenotipo de los fagos resultantes.

La generación de genomas virales híbridos entre fragmentos PstI-AvaI mutantes y silvestres del DNA de PM2 tuvo dos enfoques; uno de ellos, la construcción de plásmidos recombinantes que llevaran inserto ya sea fragmentos o el genoma total del bacteriófago PM2, en el vector de clonamiento pUC19 de manera de obtener un stock de plásmidos recombinantes del cual fuera fácil recuperar el DNA viral que se usaría para generar los genomas virales híbridos. La alternativa fue partir del genoma viral obtenido directamente de los fagos, mutante y silvestre. Una vez construidos estos genomas híbridos se transfectó la bacteria huésped *A. espejiana* BAL31, se hizo un análisis de la progenie resultante y se determinó la naturaleza de la función alterada en los fagos progenie con fenotipo mutante.

Después de haber localizado las dos mutaciones ts en replicación en un determinado fragmento PstI-AvaI del mapa físico viral, por análisis posterior se asignaron ambas mutaciones a un fragmento Sau 96I de 3,6 Kb.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. Medios de cultivo y soluciones

Medio AMS : NaCl 26,0 g; KCl 0,7 g; MgSO₄ 7 H₂O 8,0 g; CaCl₂.2H₂O 1,5 g por litro de agua bidestilada

Medio NB : Nutrient Broth al 8,0 %

Medio AMS-NB : caldo nutritivo 0,8% en AMS

Medio LB : Triptona 10,0 g; extracto de levadura 5,0 g; NaCl 5,0 g por litro de agua bidestilada

AMS-Mg : MgSO₄.7H₂O 12,0 g; KCL 0,7 g; CaCl₂.2H₂O por litro de agua bidestilada

AMS-MgNB : NB 8,0 g en 100 ml de AMS-Mg

Medio minimo M9 : Na₂HPO₄ 0,6 g; KH₂PO₄ 0,3 g; NaCl 0,05 g; NH₄Cl 0,1 g; agar 1,5 g; 100 ml de H₂O, esterilizar y enfriar a 50°C para posteriormente agregar : MgSO₄ 1M 0,2 ml; CaCl₂ 1M 0,01 ml; glucosa al 20% 1,0 ml; Tiamina-HCl 1M 0,1 ml.

Agar base : agar al 1,5% en medio AMS-NB o agar al 1,5% en medio LB

Agar blando : agar al 0,5% que contiene triptona al 0,8% en medio AMS.

2.2 Soluciones

Solución de BrEt : 5,0 mg/ml. Se usa a una concentración final de 0,5 ug/ml

Solución disruptora 5X : 5% SDS; 25% glicerol v/v; 25 mM EDTA Na pH 7,2.

Solución Tris-Calcio : 50 mM CaCl₂; 10 mM Tris HCl (pH 8,0)

Solución de X-Gal : 20 mg/ml de Xgal en N,N' dimetilformamida.

Solución de IPTG (0,1M) : IPTG 1,2g en 50 ml de H₂O

2.2.1 Soluciones en preparación de DNA plasmidial

Solución I : 50 mM Glucosa en 25mM Tris-HCl, pH 8.0

Solución II : 1% SDS en 0.2 N NaOH

Solución III : 3 M acetato de sodio; 2 M ácido acético

Solución STE : 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA en 10 mM Tris-HCl

2.2.2 Soluciones para reacciones enzimáticas.

Con AvaI y PstI : 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT en 10 mM Tris-HCl pH 7.5

Con Sau 96I : 50 mM acetato de potasio; 20 mM Tris acetato; 10 mM acetato de magnesio; 1mM DTT, pH 7,9.

DNA ligasa de T4: 5 mM MgCl; 5 mM DTT; 1 mM ATP; 50-100 ug/ml BSA en 6,6 mM Tris HCl, ph 7,6

2.3 Tampones

- BD : 1 M NaCl en 20 mM Tris HCl, pH 8,1
- TE : 1 mM EDTA en 10 mM Tris HCl, pH 8,0
- GLD : 0,25 % de azul de bromofenol, 35 % de glicerol
- TAE : 1 mM EDTA en 40 mM Tris acetato, pH 8,0
- E : 4 M Tris; 0,1 M EDTA; 0,5 M acetato de sodio, pH 7,8
- HMP-citrato 10X : 62,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 29,4 mM KH_2PO_4 ; 1 M citrato trisódico $2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,2

2.4 Antibióticos

Se utilizó ampicilina (Ap), y cloranfenicol (Cn), de Laboratorios Chile. Para *E. coli* la concentración de Ap empleada fue de 50 ug/ml y la de Cn 35 ug/ml.

2.5 Enzimas y DNAs

- Endonucleasa de restricción AvaI, PstI, Sau 96I y DNA ligasa de T4 (Biolabs Inc.USA)
- Lisozima (Sigma, Chemical Company USA)
- DNA del bacteriófago PM2
- DNA de plásmidos pUC; DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII; DNA del bacteriófago ØX 174 digerido con HaeIII fueron donados por S.Pichuantes.
- DNA de los plásmidos pPM31, pPMts20, pPM83 y pPM 4.19.11, los cuales corresponden a plásmidos híbridos que llevan inserto el DNA total de PM2 silvestre (pPM31) y mutante ts71 (pPMts20); los fragmentos silvestres PstI-AvaI de 7,5 Kb (pPM83) y el de

2,5 Kb (pPM4.19.11) clonados en pUC9, fueron obtenidos en nuestro laboratorio.

2.6 Cepas bacterianas.

Se utilizó como célula huésped del bacteriófago PM2 a *A. espejiana* BAL31 aislada de agua de mar por Espejo y Canelo (11,12).

E. coli cepa JM 109: (endA1, recA1, syrA96, thi, hsdR17(r_k^- , m_k^+) relA1, supE44, λ^- , Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^{qz}/ M15].

E. coli cepa JA 221: rec A1, leu⁻B6, trp Δ E5, hsd R⁻, hsdM⁺, lacY para la transformación con los plásmidos híbridos entre pUC19 y el inserto de interés.

2.7 Bacteriófagos

Se utilizaron el bacteriófago PM2 tipo silvestre, aislado y descrito por Espejo y Canelo (11), y los fagos mutantes termosensibles en replicación de DNA del bacteriófago PM2, ts71 y ts79 (8).

2.8 Cultivos bacterianos.

Se cultivó *A. espejiana* en medio AMS-NB con agitación constante a 26-28 °C. El cultivo se preparó con un inóculo crecido la noche anterior y se cuantificó el crecimiento midiendo la D.O a 570 nm. Los cultivos se usaron en fase de

crecimiento estacionario para la cuantificación del virus, y en fase de crecimiento exponencial para los diversos experimentos.

2.9 Suspensión de PM2 (Lisado de *A. espejiana*).

Diez ml de medio AMS-NB se inocularon con *A. espejiana* BAL31 tratando de obtener una DO de 0.050-0.100 a 570 nm. Se crecieron las células a temperatura ambiente con agitación continua hasta una DO de 0.250-0.300 a 570 nm. Se infectó con una placa de lisis fresca, se dejó en reposo por 10-20 min para la adsorción del fago y se continuó agitando hasta lisis celular total. Al lisado se le adicionó NaCl y benzamidina a una concentración final de 1 M y 4 mM respectivamente, posteriormente se centrifugó por 15 min a 12.100 g, para eliminar restos celulares y se guardó el lisado a 4°C.

Los procesos de centrifugación utilizando tanto centrifuga Sorvall como microcentrifuga Eppendorf fueron realizados a 4°C.

2.10 Purificación de PM2 (11).

Se infectó un cultivo celular de aproximadamente 600 ml a una D.O de 0.250-0.300 a 570 nm con una alícuota de suspensión fresca de PM2 de modo de tener una relación fago : bacteria menor de 1.

Una vez obtenido el lisado celular total se dejó en hielo por 30 min. Todos los pasos siguientes se realizaron a 4°C. Se centrifugó el lisado por 20 min a 12.000 g. Al sobrenadante de

centrifugación se le adicionó PEG 6.000 al 6% (p/v) y NaCl hasta una concentración final de 1 M y se dejó que sedimentara toda la noche. Se centrifugó a 5.900 g por 40 min y el sedimento obtenido se resuspendió a homogeneidad en tampón BD frío y se centrifugó por 15 min a 12.000 g. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo limpio y el sedimento se resuspendió en una nueva alícuota de tampón BD frío. Este procedimiento de transferir el sobrenadante y resuspender el pellet en tampón BD frío, se repitió tantas veces como fue necesario para eliminar la mayor cantidad de restos celulares. El volumen total de suspensión de fagos obtenido al final se centrifugó por 20 min a 12.000 g y el sobrenadante se centrifugó por 90 min a 100.000 g para sedimentar el fago. Los sedimentos virales se resuspendieron en tampón BD y se dejaron en reposo toda la noche a 4°C. Los fagos resuspendidos se purificaron en una gradiente de CsCl (2g en 5 ml de tampón BD), mediante centrifugación por 8 h a 125.000 g, se recuperó de la gradiente la banda opalescente con el fago y se dejó en reposo toda la noche a 4 °C en tampón BD y luego se concentró el fago por centrifugación a 112.000 g por 75 min. El fago fue finalmente resuspendido en 50 ul de tampón BD.

2.11 Cuantificación del Bacteriófago

A 2.5 ml de agar blando a 37°C se adicionaron 0,3 ml de células BAL31 en fase estacionaria y 0,1 ml de la dilución apropiada del bacteriófago en tampón BD. Esta mezcla se virió

sobre agar AMS-NB y las placas se incubaron toda la noche a 20°C o 30°C según fuera el caso.

2.12 Preparación del DNA de PM2

El fago purificado se diluyó en tampón TE hasta completar un volumen de aproximadamente 1 ml, se agregó SDS a una concentración final de 1% y se agitó suavemente a temperatura ambiente, hasta aclaramiento total de la suspensión. Se realizaron 3-4 extracciones de proteínas, la primera extracción con un volumen de fenol y las siguientes con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). En cada extracción se centrifugó la suspensión a 3.000 g por 5 min a 4°C. Las fases fenólicas se extrajeron con medio volumen de tampón TE. Se reunieron las fases acuosas y se extrajo una vez con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). A la fase acuosa final recuperada se le agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 6,0 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó para sedimentación toda la noche a -20°C. El DNA se colectó centrifugando 30 min a 12.000 g y a 4°C, el sedimento seco se resuspendió en tampón TE. El DNA se analizó mediante electroforesis en un minigel de agarosa al 0,7% y las bandas de DNA se visualizaron después de tinción del gel con BrEt y exposición a luz UV.

2.13 Preparación de DNA plasmidial

a) en pequeña escala

Todas las centrifugaciones fueron realizadas en microcentrifuga Eppendorf.

Se inocularon clones de *E. coli* en medio LB y Ap (50 ug/ml), y se incubaron toda la noche a 37°C. Alicuotas de 1,5-3,0 ml de cultivo se centrifugaron por 2 min para coleccionar las células. El sedimento celular se resuspendió en 100 ul de solución I (10 mM EDTA; 50 mM glucosa en 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) helada y se incubó a 4°C por 2,5 min y luego a temperatura ambiente por otros 2.5 min, posteriormente se adicionaron 200 ul de solución II (1% SDS en 0.2 N NaOH), se mezcló por inversión y se incubó a 4°C por 5 min. En seguida, se adicionaron 150 ul de solución III (3 M acetato de sodio; 2 M ácido acético), se mezcló por inversión, se incubó a 4°C y se centrifugó por 5 min. La fase acuosa se extrajo con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1) y una última extracción con un volumen de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), después de cada adición de la mezcla de solventes se incubó a 4°C por 30 s y se centrifugó por 4 min, al volumen final de fase acuosa recuperada se le adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto se mezcló por inversión y se dejó durante toda la noche a - 20°C. El DNA obtenido se colectó por centrifugación a 4°C y fue resuspendido en tampón TE o en agua desionizada estéril.

El DNA de cada clon se analizó por electroforesis en gel de

agarosa al 0.7 % y se visualizó con luz UV.

b) en gran escala

Se inoculó una alícuota de un cultivo de noche en 100 ml de medio LB con Ap (50 ug/ml) y se incubó con agitación a 37°C por aproximadamente 4.5 h hasta alcanzar una DO de 0.600 a 590 nm. En ese momento se adicionó Cn (170 ug/ml) y se continuó la agitación durante toda la noche. Al día siguiente las células se colectaron por centrifugación a 1.900 g por 15 min. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de una solución fría de STE. Posteriormente se centrifugó a 4.300 g por 10 min, y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 2 ml de solución I conteniendo lisozima (4 mg/ml). Luego de mantener en hielo por 15 min, se agregaron en orden la solución II y la solución III incubando a 4°C por 15 min cada vez.

La suspensión se centrifugó a 12.000 g por 30 min, al sobrenadante se agregó igual volumen de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se centrifugó a 12.000 g por 20 min, se eliminó el sobrenadante y sedimento se resuspendió en 1 ml de tampón TE. A la suspensión se adicionó RNasa (10 mg/ml) y se incubó a 65 °C por 15 min, terminada ésta incubación se adicionaron 500 ul de una solución conteniendo PEG al 30% y NaCl 1,5 M y se incubó 30 min en hielo. Posterior a una centrifugación a 12.000 g por 30 min, el sedimento se resuspendió en 500 ul de tampón TE. Luego se realizaron dos extracciones con fenol:

cloroformo: alcohol isoamilico y una extracción con cloroformo: alcohol isoamilico. Se dejó sedimentar en 2,5 volúmenes de etanol más 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M. Finalmente se colectó el DNA centrifugando en microcentrifuga a 4°C y el sedimento seco se resuspendió en tampón TE.

La muestra se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% y se visualizó con luz U.V.

2.14 Infección de esferoplastos de *A. espejiana* BAL31 con DNA purificado de PM2 (38)

Diez ml de cultivo fresco de BAL31 se dejaron 1 min en hielo, luego se centrifugó por 5 min. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. El sedimento celular fue resuspendido en 0,2 ml de BD frío y se dejó incubando 1 min, enseguida se agregaron 16 ul de lisozima (2 mg/ml en HMP-citrato), se incubó durante 2 min y se adicionaron 24 ul de solución de EDTA al 4 %, se dejó incubando durante 9 min para posteriormente agregar 0,8 ml de MgAMS-NB e incubar por 10 min adicionales. Los esferoplastos se dejaron en hielo por 5 min para su transfección.

A 100 ul de esferoplastos se agregó una muestra de DNA en tampón HMP-citrato hasta completar un volumen final de 250 ul, y se incubó durante 15 min a 4°C. Posteriormente se adicionó 0,8 ml de AMS-NB y se plaqueó inmediatamente en placas AMS-NB para cuantificar infectividad.

2.15 Detección de DNA viral intracelular (8)

Se infectaron 2 ml de células BAL31 crecidas en AMS-NB hasta una DO de 0.300 a 570 nm (aproximadamente 2×10^8 cel/ml) y equilibradas a 30° C, de manera de tener una concentración aproximada de $3,0 \times 10^9$ ufp/ml (m.o.i = 15), después de 35 min 1,5 ml de células infectadas se centrifugaron por 3 min en microcentrifuga, se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 100 ul de solución disruptora. Las muestras se guardaron a -20° C para posteriormente realizar la electroforesis.

Como control se realizó en cada ensayo una infección con el fago silvestre.

2.16 Electroforesis en gel de agarosa (33)

a) Agarosa de tipo II

Se disolvió agarosa tipo II por ebullición en tampón E a una concentración final de 0,7 %. Se cargaron las muestras de DNA resuspendidas en tampón TE, más tampón de carga. Se utilizó tampón Tris acetato como tampón de corrida.

Se corrió la electroforesis por 3 h con un voltaje constante de 30-40 volts cuando fueron minigeles. Para geles de mayor tamaño, se empleó un voltaje constante entre 40-50 volt.

Se utilizó como estándar de peso molecular el DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima Hind III y DNA del fago OX 174 digerido con Hae III. Esto permitió calcular el PM

relativo y la concentración aproximada de las muestras.

b) Agarosa de bajo punto de fusión

Se disolvió la agarosa por ebullición en tampón E a una concentración final de 1 %. El tampón de corrida utilizado fue Tris acetato, la electroforesis se corrió con un voltaje constante de 40-50 volt y las bandas se visualizaron con luz UV.

2.17 Extracción del DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión

Se cortó el trozo de gel que contenía la banda de DNA de interés y se traspasó a un tubo de 15 ml y se fundió a 65°C por 5 min, se le adicionó luego 5 volúmenes de tampón TE a temperatura ambiente y se volvió a calentar otros 5 min a 65°C. Una vez enfriada la solución se realizó una extracción con fenol y otra con fenol: cloroformo (24:1). A la fase acuosa que contenía el DNA se le adicionó 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M, 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -20°C durante toda la noche.

El DNA se colectó por centrifugación a 5000 g por 20 min a 4°C, y fue resuspendido en tampón TE.

2.18 Reacciones enzimáticas

a) Reacción de restricción

Se llevó a cabo en un volumen final de 40 ul el que contenía

la muestra de DNA en agua bidestilada, 1/10 de tampón salino 10X requerido por la enzima de restricción utilizada, agua bidestilada necesaria para completar un volumen final deseado, y sobre esta mezcla se adicionó 1-2 ul de la enzima de restricción respectiva, luego se incubó a 37°C por 2 h. La reacción se detuvo por congelamiento de la muestra a -20°C. La reacción de restricción se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %.

Cuando se realizó restricción doble con PstI y AvaI, debido a que ambas enzimas son activas en las mismas condiciones salinas, se agregó después de la primera incubación enzimática la segunda enzima y se incubó nuevamente a 37°C por 2 h.

b) Reacción de ligamiento

Se llevó a cabo en un volumen final de 20 ul que contenía el DNA para ligar, 1/5 de volumen de tampón salino 5x, 1 ul de ATP 100 mM y 1 ul de DNA ligasa de T4 100 U/ul. La mezcla se incubó durante toda la noche a 12 °C. La reacción se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %.

2.19 Construcción de genomas virales híbridos entre fragmentos del DNA de PM2 silvestre y mutante.

El DNA de PM2, tanto de los fagos mutantes como el del silvestre, fue digerido con la(s) enzima(s) de restricción correspondiente(s), generándose, en un caso los fragmentos PstI-

AvaI de 7,5 y 2,5 Kb, y en el otro los fragmentos Sau 96I de 6,9 y 3,6 Kb, los cuales fueron separados y recuperados después de electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión.

Una vez verificada la recuperación de los fragmentos en una electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % , se procedió a generar genomas virales híbridos, incubando las combinaciones respectivas de fragmentos con DNA ligasa de T4.

2.20 Preparación de bacterias *E. coli* competentes. (33)

Se inoculó medio LB con 1/100 de volumen de cultivo de 18 h de *E. coli* y se creció en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO de 0,500-0,600 a 570 nm. Todo el procedimiento se realizó en frío. Las células se colectaron por centrifugación a 5.900 g por 5 min, el sedimento se resuspendió en 1/2 volumen de MgSO₄ 10 mM frío y se incubó 10 min a 4°C, luego se centrifugó a 5.900 g por 5 min, el sedimento se resuspendió en 1/2 volumen de Tris-Calcio pH 7,8 frío y se incubó en hielo por 20 min. Las células se colectaron por centrifugación a 3.000 g por 5 min, y el sedimento se resuspendió en 1/10 de volumen de Tris-Calcio frío.

2.21 Transformación de *E. coli* (33)

A 100 ul de células competentes se agregaron 5 ul de MgCl₂ 100 mM y DNA plasmidial y Tris-Calcio hasta completar un volumen final de 150 ul. Esta mezcla se incubó 30 min, y luego se dió un pulso de calor a 42°C por 2 min. La mezcla se diluyó con medio LB

y se incubó con agitación a 37°C por 60 min. Se centrifugó a 1.000 g por 3 min a temperatura ambiente, las células se resuspendieron en 200 ul de medio LB y se sembraron en Agar-LB con el antibiótico de selección. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

Cuando se transformó la cepa de *E.coli* JM 109, con el fin de identificar clones transformantes por el desarrollo de colonias blancas, las placas de agar LB-Ap fueron previamente incubadas alrededor de 30 min con Xgal (40 ug/ml) e IPTG (0,5 mM).

III. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

3.1 CLONAMIENTO DEL DNA DE PM2 MUTANTE ts79

La estrategia utilizada en el clonamiento del genoma viral mutante ts79 en el vector pUC19 se encuentra esquematizada en la **Figura 4.**

El plásmido pUC19, posee el gen amp^r que confiere a la célula la capacidad de crecer en un medio selectivo con Ap y también presenta una porción del gen lac Z de *E. coli*. Si este plásmido es introducido en *E. coli lac⁻*, en placas con el indicador apropiado da origen por complementación a colonias azules lac⁺, pero originará colonias blancas lac⁻ cuando el fragmento del gen lac Z del plásmido ha sido interrumpido al clonar el fragmento de DNA en cualquiera de los sitios de restricción que presenta. Debido a lo anterior este vector permite seleccionar los clones transformantes, ya sea por su resistencia al antibiótico Ap, o bien combinando ambas características, es decir, su resistencia a Ap y la formación de colonias blancas en *E. coli lac⁻*.

La transformación de *E. coli* JA 221 se realizó con la mezcla de los productos de ligación entre pUC19 y el DNA total del mutante de PM2 ts79. Se obtuvieron 80 clones amp^r y se utilizaron 50 colonias para realizar el análisis plasmidial a través de mini-preparaciones de DNA. La identificación preliminar de aquellos clones que poseían el plásmido recombinante se realizó

Mapa de restricción de PM2

Mapa de restricción de pUC

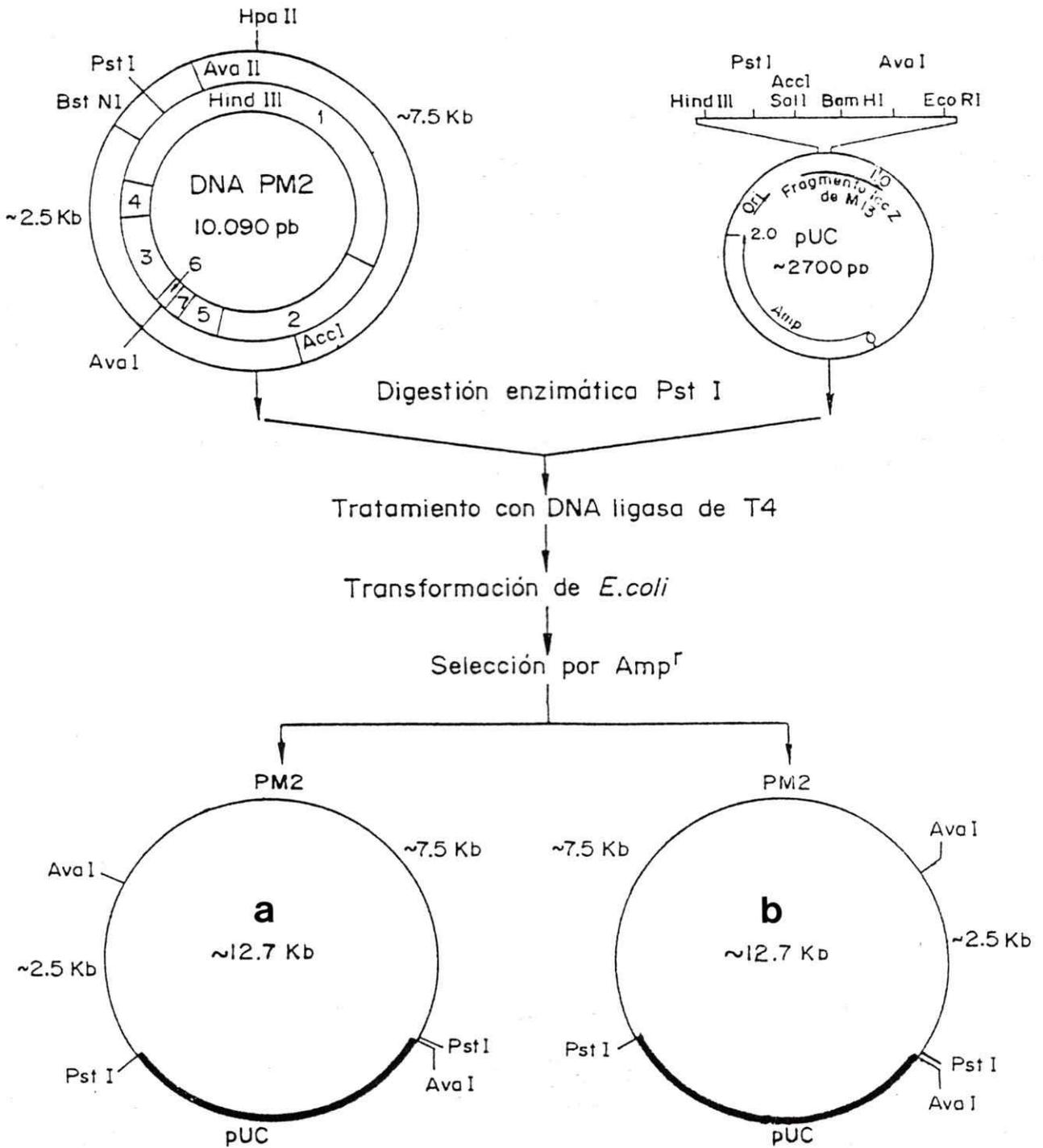


FIGURA 4: Estrategia de clonamiento del genoma total de PM2.

a y b muestran las dos posibles orientaciones del inserto en el plasmido recombinante. Los plasmidos recombinantes pPM31, pPMts20 y pPMts79 llevan en la orientación b el genoma de PM2 silvestre, ts71 y ts79 respectivamente.

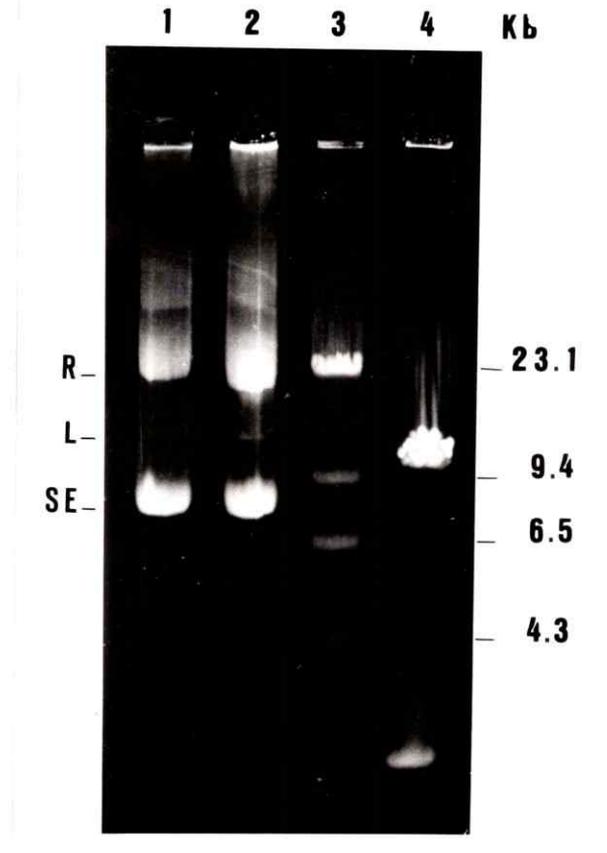


FIGURA 5 ANALISIS ELECTROFORETICO DEL INSERTO DEL PLASMIDO RECOMBINANTE pPMts79.

El DNA del plásmido pPMts79 fué digerido a 37°C por 120 min con PstI y cargado en un gel de agarosa al 0,7 %. La electroforesis se realizó a 35 volt durante 3 h. Se usó como control el plásmido recombinante de 12,7 Kb pPM31. Carril 1; DNA de pPM31; carril 2: DNA de pPMts79; carril 3 : DNA del bacteriófago lambda digerido con Hind III y carril 4 : DNA de pPMts79 digerido con PstI.

Formas de DNA R: circular relajada; SE: circular sobre enrollada y L: lineal

por medio de electroforesis en gel de agarosa. En este análisis se utilizó como control de peso molecular el plásmido pPM31 que corresponde al DNA total de PM2 silvestre clonado en pUC9 y tiene un tamaño de 12,7 Kb. En la Figura 5, carril 2, se observa que uno de los plásmidos híbridos, pPMts79 presenta el mismo patrón de bandas que el control de 12,7 Kb (comparar con carril 1).

Se verificó la presencia de un inserto correspondiente a la molécula de DNA de 10,2 Kb del DNA de PM2 ts79, por digestión con la enzima PstI del DNA de los 50 clones recombinantes seleccionados en primera instancia. En la Figura 5, carril 4, observamos que después de digestión con PstI, pPmts79 dio origen a una banda de 10,2 Kb que correspondería al DNA del mutante ts79 y una banda de 2,7 Kb del DNA del vector pUC19.

3.2 CLONAMIENTO DEL FRAGMENTO DE 2,5 Kb DEL DNA DE PM2 ts71 y ts79

La estrategia de clonamiento de los fragmentos de 2,5 Kb PstI-AvaI del DNA de los mutantes ts71 y ts79 implicó el aislamiento del fragmento para ser insertado en el vector pUC19. Para tal efecto se digirió el DNA de los fagos mutantes en replicación, ts71 y ts79, con las enzimas de restricción PstI y AvaI, luego se procedió a separar los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y se recuperaron del gel los fragmentos de 2,5 Kb PstI-AvaI de ambos mutantes. Se realizó un análisis electroforético del DNA

recuperado y se comparó la posición de la banda con bandas del DNA de lambda digerido con HindIII.

El fragmento PstI-AvaI de 2,5 Kb de cada uno de los mutantes de PM2, ts71 y ts79, fue mezclado independientemente con pUC19, que había sido digerido previamente con ambas enzimas. Posteriormente se incubó la mezcla de DNAs con la enzima DNA ligasa de T4, lo que debiera generar una molécula híbrida de 5,2 Kb, como se encuentra esquematizado en la Figura 6.

Se transformó *E. coli* en forma separada con cada una de las mezclas de ligación, es decir, una en que se ligó pUC19 con el fragmento de 2,5 Kb PstI-AvaI del mutante ts71, y otra, en la cual pUC19 se ligó con el fragmento de 2,5 Kb PstI-AvaI del mutante ts79. Los clones resultantes de la transformación fueron seleccionados por su resistencia a Ap y por la formación de colonias blancas en placas que contenían el sustrato cromógeno Xgal y el inductor IPTG. Se procedió al análisis de las 10 colonias blancas Ap^r obtenidas, determinando primero si presentaban el plásmido híbrido del tamaño esperado de 5,2 Kb, para lo cual se preparó DNA plasmidial seguido de una electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 7, carril 2, observamos que el plásmido híbrido pPMts1 presenta el mismo patrón de bandas que el plásmido híbrido control pPM4.19.11, cuyo inserto es el fragmento silvestre PstI-AvaI de 2,5 Kb.

Para verificar el inserto viral, el DNA plasmidial híbrido de 5,2 Kb se trató con la enzima de restricción PstI y se realizó una electroforesis del DNA plasmidial en gel de agarosa. En la

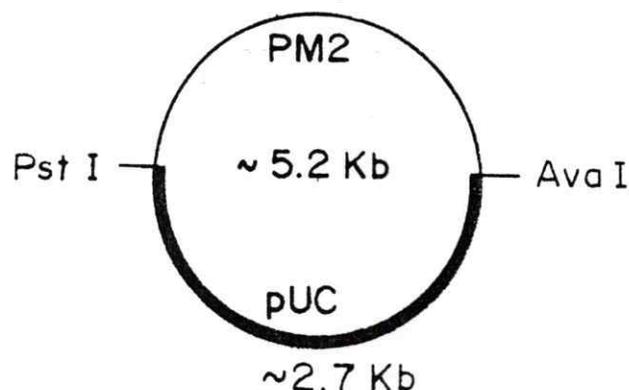


FIGURA 6 ESQUEMA DE PLASMIDO RECOMBINANTE CON INSERTO VIRAL DE 2,5 Kb.

Los DNA de los fagos ts71 y ts79 fueron digeridos independientemente con PstI y AvaI, los fragmentos separados por electroforesis y recuperado del gel el fragmento de 2,5 Kb. Se ligó este fragmento con el DNA de pUC19 linearizado con PstI y AvaI, se transformó *E.coli* JM109 y se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina y blancas en presencia de Xgal.

pPMts71 = plásmido recombinante con inserto de 2,5 Kb de fago mutante ts71

pPMts10 = plásmido recombinante con inserto de 2,5 Kb de fago mutante ts79

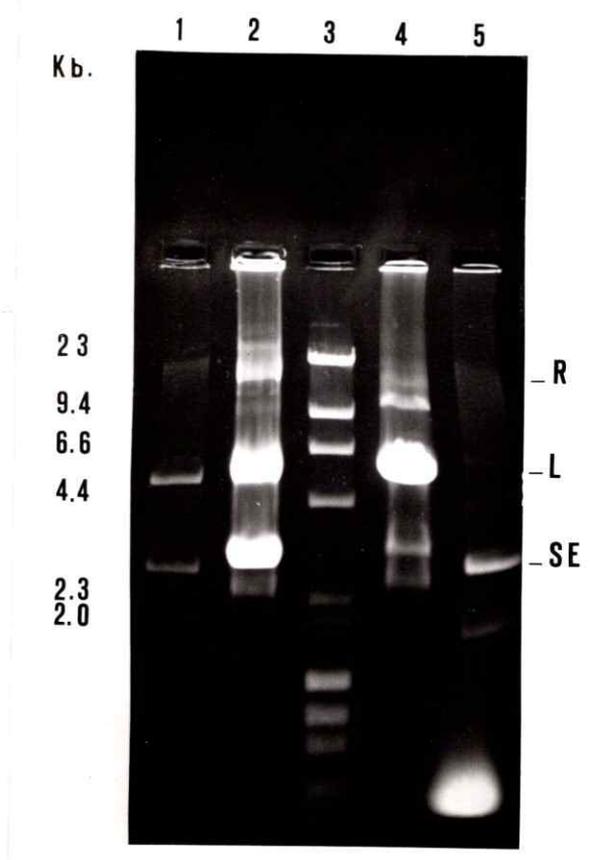


FIGURA 7 ANALISIS ELECTROFORETICO DE UNO DE LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES pPMts1.

El DNA del plásmido pPMts1 fué digerido a 37°C por 120 min con PstI y cargado en un gel de agarosa al 0,7%. la electroforesis se realizó a 35 volt durante 3h. Se usó como control el plásmido recombinante de 5,2 Kb pPM4.19.11. Carril 1: pPM4.19.11; carril 2: DNA del plásmido pPMts1; carril 3: DNA del fago lambda digerido con Hind III y del fago ϕ X174 digerido con Hae III; carril 4: DNA de pPMts1 digerido con PstI. Formas de DNA R: circular relajado; SE: circular sobreenrollado y L: lineal

Figura 7, carril 4 se observa que el DNA del recombinante pPMts1 digerido con PstI presenta aumentada la banda de DNA lineal de 5,2 Kb a expensas de las formas sobrenrollada y relajada.

3.3 SUBCLONAMIENTO DEL FRAGMENTO DE 7,5 Kb PstI-AvaI DEL DNA DE PM2 ts79

A partir del plásmido recombinante pPMts79, el cual lleva inserto el genoma total del bacteriófago PM2 ts79, se dió origen a un plásmido híbrido que tiene como inserto solamente el fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI del DNA de pPMts79 (Fig 8). El procedimiento experimental consistió en la digestión del DNA del plásmido pPMts 79 con la enzima de restricción AvaI que al cortar el DNA del plásmido pPMts79 en dos sitios, deja libre el fragmento viral de 2,5 Kb y genera una molécula de aproximadamente 10,2 Kb que contiene el fragmento viral PstI-AvaI de 7,5 Kb. (Fig 8)

Los fragmentos obtenidos de la digestión con AvaI se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión para recuperar la banda de DNA de 10,2 Kb. Este DNA lineal se trató con DNA ligasa de T4 y posteriormente se transformó la cepa JM 109. Las colonias transformantes se seleccionaron por su resistencia a Ap, luego fueron replicadas y analizadas mediante preparación de DNA plasmidial. Se analizaron aproximadamente 20 colonias resistentes a Ap, de las cuales sólo dos mostraron tener DNA plasmidial híbrido cuyo inserto correspondía al fragmento de

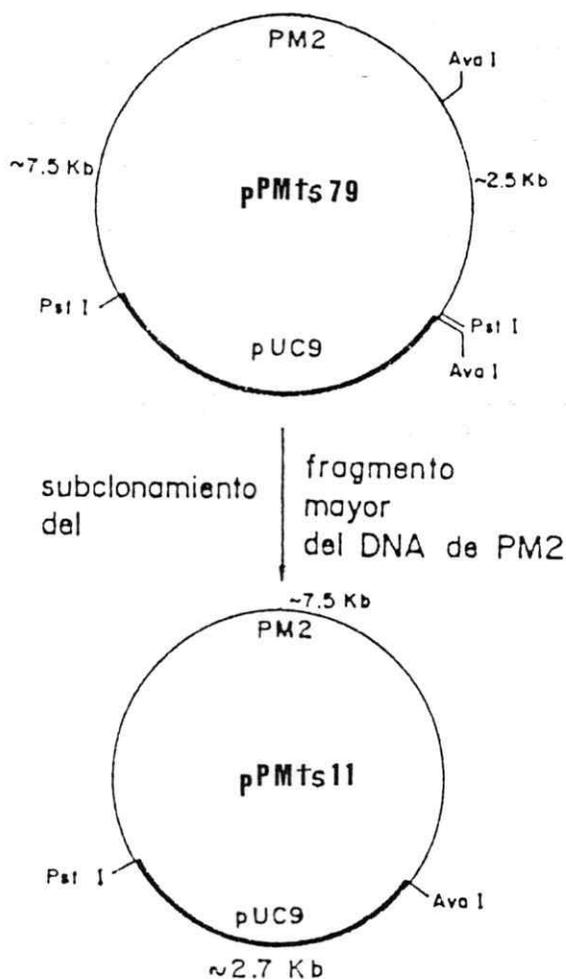


FIGURA 8:

Subclonamiento del fragmento PstI-AvaI de 7,5 Kb del DNA de PM2 ts79.

El plásmido recombinante pPMts79 fue digerido con AvaI, para eliminar el fragmento de 2,5 Kb. Posteriormente se trató con DNA ligasa y se dio origen al plásmido pPMts11 que lleva inserto el fragmento de 7,5 Kb del mutante ts79

7,5 Kb. En la **Figura 9**, **carril 2** se puede observar que el DNA plasmidial proveniente de pPMts11 presenta el mismo patrón de bandas que el plásmido híbrido control pPM83, cuyo inserto es el fragmento silvestre de 7,5 Kb PstI y AvaI (**Fig 9**, **carril 1**). En el **carril 5** de la misma figura se muestra una banda única del DNA plasmidial pPMts11 linearizado con PstI y que corresponde a un tamaño de 10,2 Kb y en el **carril 6**, el DNA de pPMts11 digerido con PstI y AvaI observándose una banda de 7,5 Kb PstI-AvaI de pPMts79 y otra de 2,7 Kb correspondiente al vector.

3.4 DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD DE GENOMA VIRAL RECUPERADO DE PLASMIDO HIBRIDO

El DNA del plásmido híbrido pPM31, que tiene inserto en el sitio de restricción PstI del plásmido pUC9 el DNA total de PM2 silvestre, fue digerido con la enzima de restricción PstI para generar dos fragmentos uno de 2,7 Kb correspondiente al vector y otro fragmento de 10,2 Kb correspondiente al DNA de PM2. Este fragmento fue recuperado de un gel de agarosa de bajo punto de fusión y luego tratado con DNA ligasa de T4. Con la muestra de DNA de PM2 silvestre recuperado y ligado se transfectó la bacteria huésped *A. espejiana* BAL31. La experiencia se repitió en tres oportunidades y en ninguna de ellas se obtuvo placas de lisis a temperatura permisiva.

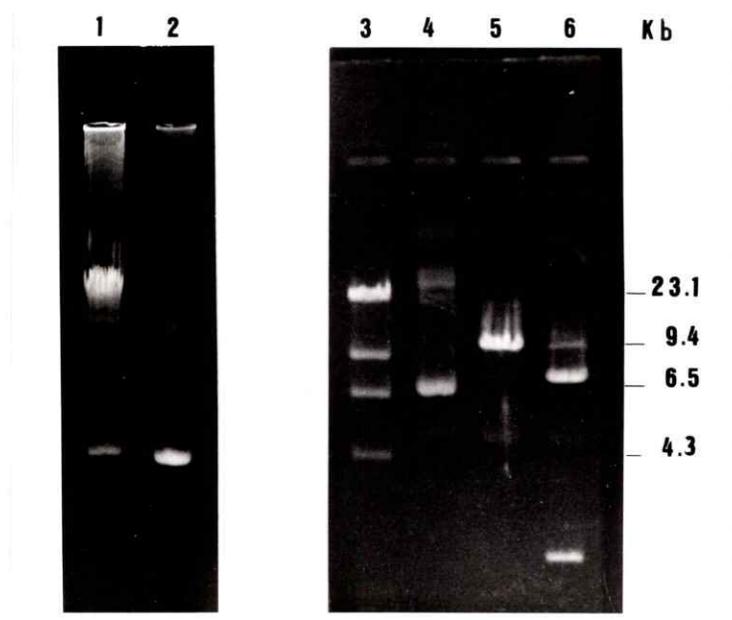


FIGURA 9 ANALISIS ELECTROFORETICO DE UNO DE LOS SUBCLONES QUE LLEVA INSERTO EL FRAGMENTO PstI-AvaI DE 7,5 Kb DEL MUTANTE ts79.

El DNA del plásmido pPMts11 fué digerido a 37°C por 120 min con PstI y luego por otros 120 min con AvaI y cargado en un gel de agarosa al 0,7 %. La electroforesis se realizó a 35 volt durante 3 h. Se usó como control pPM83 que lleva inserto el fragmento de 7,5 Kb de PM2 silvestre con un tamaño de 10,2 Kb. Carril 1: DNA del plásmido pPM83 ; carril 2 y 4 DNA del plásmido pPMts11; carril 3: DNA del fago lambda digerido con Hind III; carril 5: DNA del plásmido pPMts11 digerido con PstI; carril 6 DNA del plásmido pPMts11 digerido con PstI y AvaI.

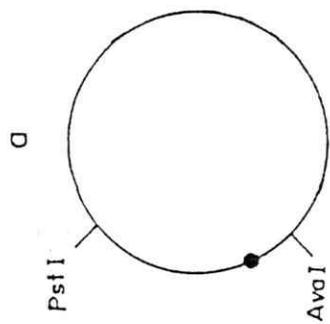
3.5 CONSTRUCCION Y ANALISIS DE GENOMAS VIRALES HIBRIDOS ENTRE FRAGMENTOS MUTANTES Y SILVESTRE PstI-AvaI DEL DNA DE PM2.

Debido a que no se logro transfectar con el DNA de PM2 proveniente del plásmido hibrido pPM31, se decidió construir genomas virales hibridos entre fragmentos mutantes y silvestres del DNA de PM2.

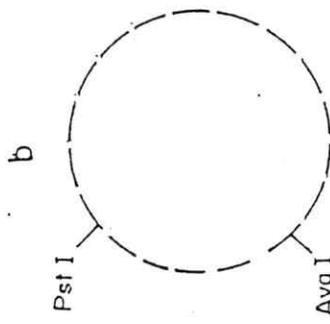
La estrategia utilizada para la construcción de genomas virales hibridos entre mutantes y silvestres se encuentra descrita en la **Figura 10**. Consistió basicamente en digerir tanto el DNA de los dos fagos mutantes, ts71 y ts79, como el del fago silvestre con las enzimas de restricción PstI-AvaI para luego combinar fragmentos mutantes PstI-AvaI con fragmentos silvestres PstI-AvaI.

El DNA viral silvestre y de los mutantes ts71 y ts79, se digirió con las enzimas de restricción PstI y Ava I, con lo cual se generaron dos fragmentos de DNA, uno de 7,5 Kb y otro de 2,5 Kb PstI-AvaI. Estos dos fragmentos virales, tanto los provenientes del fago silvestre como de los dos fagos mutantes, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y luego recuperados a partir de la banda del gel. En la **Figura 11**, carriles 1 al 4, 6 y 7 se muestran las bandas de DNA de los fragmentos de 7,5 Kb y 2,5 Kb PstI-AvaI del fago silvestre y mutante recuperados por extracción fenólica.

Genoma viral

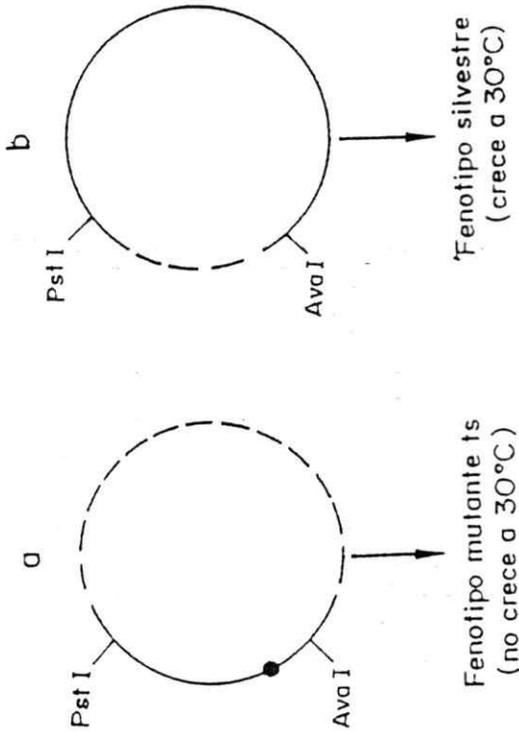


mutante ts

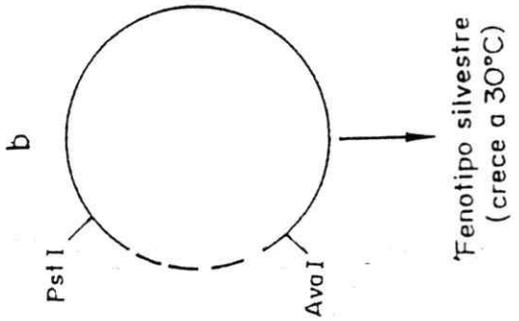


silvestre

Genoma viral reconstituido



Fenotipo mutante ts
(no crece a 30°C)



Fenotipo silvestre
(crece a 30°C)

FIGURA 10: Esquema de la estrategia utilizada en la construcción de los genomas virales híbridos entre fragmentos PstI-AvaI y la posterior localización de la mutación ts en un segmento del mapa físico de PM2.

• Sitio mutado que origina el fenotipo ts

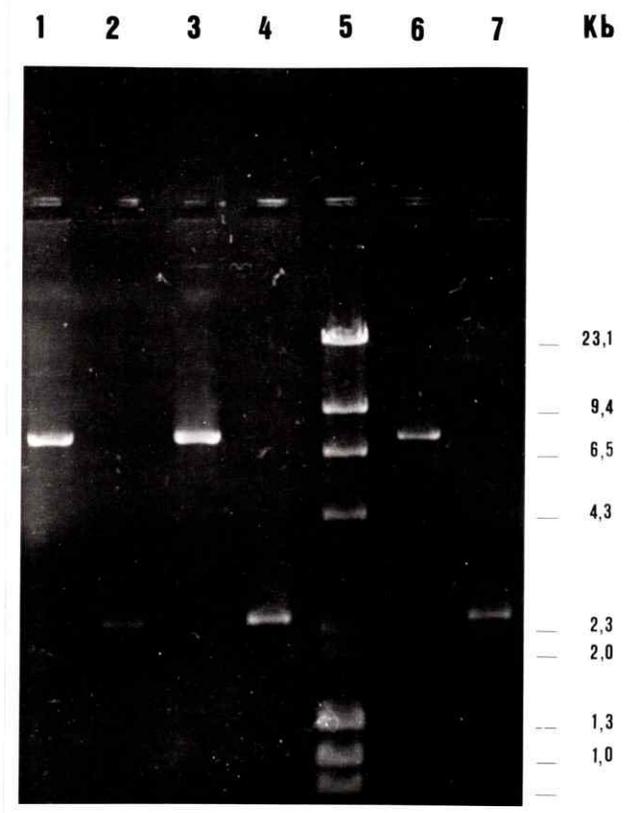


FIGURA 11 ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS FRAGMENTOS PstI-AvaI DEL DNA DE PM2 RECUPERADOS DE UN GEL DE BAJO PUNTO DE FUSION.

El DNA de los fagos mutantes y silvestre fue digerido con las enzimas de restricción PstI-AvaI, recuperados de un gel de agarosa de bajo punto de fusion y cargado en un gel de agarosa al 0,7%. La electroforesis se realizó a 35 volt durante 3 h. Se usó como control DNA del fago lambda digerido con Hind III y DNA del fago ØX174 digerido con Hae III. Carriles 1, 3 y 6 DNA del fragmento de 7,5 Kb del mutante ts71, ts79 y PM2 silvestre; carriles 2, 4 y 7 DNA del fragmento de 2,5 Kb del mutante ts71, ts79 y PM2 silvestre; carril 5: DNA del fago lambda digerido con Hind III y del fago ØX174 digerido con Hae III.

Los genomas virales híbridos se construyeron al unir un fragmento PstI-AvaI proveniente del fago mutante con otro fragmento del fago silvestre, en las dos combinaciones posibles que se encuentran esquematizadas en la **Figura 10**. Como lo indica la figura el fenotipo mutante ts corresponderá a aquel genoma viral reconstituido que no crezca a 30°C.

La mezcla entre fragmentos mutantes y silvestres se trató con DNA ligasa de T4 con lo cual se dio origen a moléculas de DNA circular de 10,2 Kb. También se ligaron los fragmentos silvestres de 7,5 Kb y el de 2,5 Kb wt, luego de ser recuperados de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, para usarlo como control al cuantificar infectividad de los genomas híbridos reconstituidos.

En la **Figura 12**, carriles 2, 4 y 6 se muestra el patrón electroforético obtenido con los genomas virales híbridos generados después de tratar la mezcla de fragmentos ts y silvestres con DNA ligasa de T4.

Las siguientes mezclas de genomas híbridos reconstituidos fueron usadas en transfección:

- Fragmento de 7,5 Kb wt + fragmento de 2,5 Kb ts 71
- Fragmento de 7,5 Kb ts 71 + fragmento de 2,5 Kb wt
- Fragmento de 7,5 Kb wt + fragmento de 2,5 Kb ts 79
- Fragmento de 7,5 Kb ts 79 + fragmento de 2,5 Kb wt
- Fragmento de 7,5 wt + fragmento de 2,5 Kb wt

Se transfectaron esferoplastos de la bacteria huésped

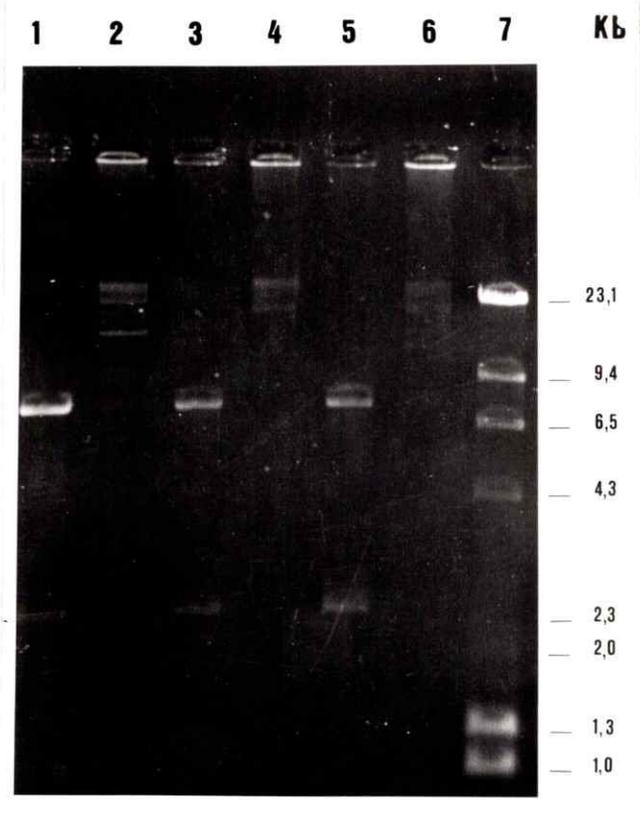


FIGURA 12 ANALISIS ELECTROFORETICO DE LA MEZCLA DE FRAGMENTOS MUTANTES Y SILVESTRE DE PM2 TRATADA CON DNA LIGASA DE T4

Los fragmentos PstI-AvaI de 7,5 y 2,5 Kb fueron mezclados y tratados a 14°C por 24 h con DNA ligasa de T4 y cargados en un gel de agarosa al 0,7 %. La electroforesis se realizó a 35 volt durante 3 h. Se usó como control cada una de las mezclas previo al tratamiento enzimático. Carril 1: fragmento de 7,5 Kb de ts71 mezclado con el fragmento de 2,5 Kb de PM2 silvestre; carril 3: fragmento de 7,5 Kb de PM2 silvestre mezclado con el fragmento de 2,5 Kb ts71; carril 5: fragmento de 7,5 Kb de PM2 silvestre mezclado con el fragmento de 2,5 Kb silvestre; carril 7: DNA del fago lambda digerido con Hind III y DNA del fago ØX174 digerido con Hae III. Carriles 2, 4 y 6 corresponden a las mezclas de los carriles 1, 3 y 5 tratadas con DNA ligasa.

A. espejiana BAL 31 y se plaquéo en placas AMS-NB que se incubaron a 20°C toda la noche. Al día siguiente se apreció la infectividad de los genomas virales híbridos recostituidos por la presencia de placas de lisis desarrolladas a 20°C. En la **TABLA 1** se encuentra el número de placas de lisis obtenidas en dos experimentos de transfección con los genomas híbridos generados con fragmentos PstI-AvaI del mutante ts71 y del mutante ts79.

El fenotipo de la progenie viral obtenida , después de tranfección con los genomas híbridos reconstituidos fue determinado por su capacidad de replicar a la temperatura restrictiva de 30°C. Para tal efecto, de cad una de las placas de lisis obtenidas después de la transfección con los genomas híbridos se realizaron dos réplicas: se pico una placa de lisis obtenida post transfección en una placa preincubada a 30°C (temperatura restrictiva) y luego en otra placa preincubada a 20°C. Posteriormente se incubaron las placas a 30°C y 20°C respectivamente, durante toda la noche, y se registró cuales de ellas se multiplicaban a ambas temperaturas, (30°C y 20°C), y cuales no lo hacían a 30°C. Los resultados obtenidos en la **TABLA 1** indican que el fenotipo ts se encuentra cuando el genoma viral híbrido lleva el fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI del fago mutante, puesto que en este caso son incapaces de crecer a 30 °C.

Con el fin de verificar la función alterada en los mutantes ts , se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % si existía síntesis de DNA intracelular en infección a

TABLA I

ANALISIS FENOTIPICO DE PLACAS DE LISIS OBTENIDAS POR TRANSFECCION CON GENOMAS VIRALES HIBRIDOS

a) N° DE PLACAS DE LISIS OBTENIDAS EN DOS EXPERIMENTOS DE TRANSFECCION

b) N° DE CLONES QUE MOSTRARON BANDAS DE DNA VIRAL / N° DE CLONES

DNA viral híbrido	N° de placas de lisis	multiplicación a		DNA viral intracelular a 30°C
		20°C	30°C	
1- 7,5 Kb ts71	4	4/4	0/4	0/4
2- 2,5 Kb ts71	31	31/31	31/31	5/5
3- wt + wt	11	11/11	11/11	3/3
4- DNA de PM2 silvestre	839	51/51	51/51	4/4
5- 7,5 Kb ts79	12	12/12	0/12	0/7
6- 2,5 Kb ts79	18	18/18	18/18	2/2
7- wt + wt	0	0	0	0
8- DNA de PM2 Silvestre	714	34/34	34/34	3/3

temperatura restrictiva (30°C) con los fagos progenie.

Se lisaron las células infectadas a los 35 min post infección. El análisis electroforético de las muestras dio el patrón de bandas mostrado en la **Figura 13**. Como se observa en los **carriles 4, 5 y 6** cuando el genoma híbrido estaba constituido por los fragmentos de 2,5 Kb PstI-AvaI de PM2 ts71 y el fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI de PM2 silvestre, el patrón de bandas obtenido, es similar al obtenido en la infección con DNA silvestre, (**carril 1**). En cambio, cuando el genoma híbrido estaba constituido por el fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI ts 71 y 2,5 Kb PstI-AvaI silvestre, las bandas de DNA viral fueron escasamente visibles (**carril 3**).

Cuando como control se infectó con genoma viral reconstituido con ambos fragmentos PstI-AvaI de 2,5 Kb y 7,5 Kb silvestre **carril 7**, el patrón de bandas obtenido fue similar al observado en los **carriles 1, 4, 5 y 6**.

Estos resultados fueron similares a aquellos obtenidos cuando el genoma híbrido estuvo constituido por fragmentos PstI-AvaI del mutante ts79.

En la **TABLA 1** última columna están resumidos los datos con respecto a la existencia o no de DNA viral intracelular a 30°C tanto en los fagos híbridos progenie con fenotipo ts como en aquella progenie que dio fenotipo silvestre. Dichos resultados permiten sostener que la mutación ts en replicación de los mutantes ts71 y ts79 se encuentra ubicada en el fragmento de 7,5

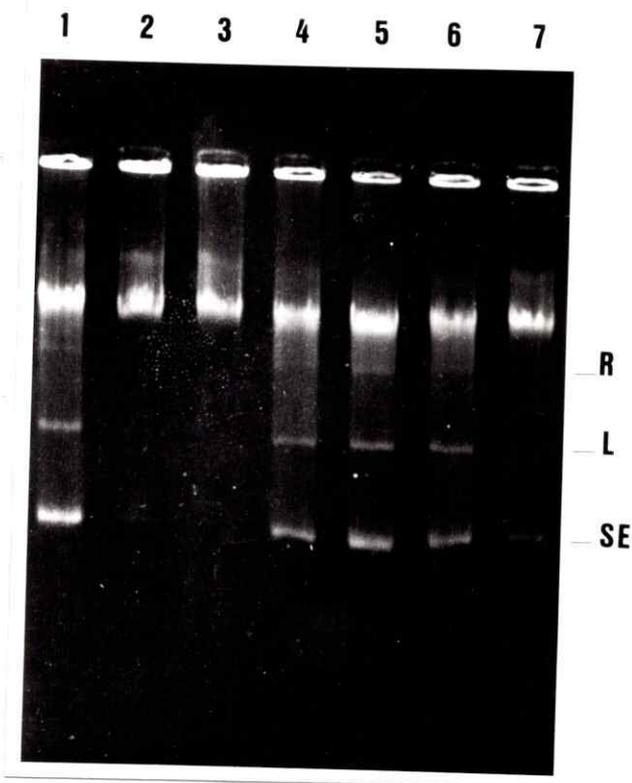


FIGURA 13 ANALISIS ELECTROFORETICO DEL DNA VIRAL SINTETIZADO A 30°C POR FAGOS CON DNA HIBRIDO.

Se infectaron células BAL31 con las diferentes mezclas de fragmentos tratadas con DNA ligasa y se usó como control células sin infectar y células infectadas con DNA del fago silvestre. Posteriormente las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0,7 % . La electroforesis se realizó a 35 volt durante 5 h. Carril 1: células infectadas con fago silvestre; carril 2: células no infectadas; carriles 3-7: células infectadas con fago con genoma: 7,5 Kb ts71 + 2,5 Kb silvestre (carril 3); 2,5 Kb ts71 + 7,5 Kb silvestre (carriles 4, 5 y 6); 2,5 Kb silvestre + 7,5 silvestre (carril 7)

Formas de DNA viral R: circular relajada; SE: circular sobreenrollada y L: lineal .

Kb PstI-AvaI del mapa físico de PM2.

3.6 ACOTACION DE LA UBICACION DE LA MUTACION ts EN REPLICACION DEL BACTERIOFAGO PM2

Con el fin de acotar en que porción del fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI donde se encuentra la mutación ts del gen de replicación del bacteriófago PM2, se decidió construir genomas virales híbridos con fragmentos mutantes y silvestres que contemplaran un subfragmento del fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI ts en replicación y que el resto del genoma correspondiera a DNA silvestre.

Considerando el mapa físico de restricción de PM2 (Figura 3) una manera de generar un subfragmento del fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI es digerir el DNA total del bacteriófago con la enzima de restricción Sau96I, que da como producto de la reacción de restricción un fragmento de 3,6 Kb Sau 96I (subfragmento del fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI) y otro de 6,9 Kb Sau 96I que corresponde al fragmento de 2,5 Kb PstI-AvaI y el resto del fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI (Figura 3)

3.7 CONSTRUCCION DE GENOMAS VIRALES HIBRIDOS ENTRE FRAGMENTOS ts y wt Sau 96I DEL DNA DE PM2

El genoma total de PM2 silvestre y ts fue digerido con la enzima Sau 96I dando origen a los fragmentos de 3,6 y 6,9 Kb.

Verificada la reacción de restricción, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% para recuperar ambos fragmentos Sau 96I. En la **Figura 14**, se muestra el patrón electroforético de cada uno de los fragmentos recuperados.

Con los fragmentos Sau 96I de 6,9 y 3,6 Kb recuperados se construyeron los genomas virales híbridos entre fragmentos Sau 96I mutantes y silvestres, de tal manera que se generaran genomas virales híbridos en las dos combinaciones posibles que se encuentran esquematizadas en la **Figura 15**. En esta figura el fenotipo mutante está representado por el tipo "a", puesto que ese genoma viral híbrido reconstituido es incapaz de crecer a temperatura restrictiva de 30°C.

Los fragmentos Sau 96I ts y silvestres de PM2 fueron mezclados para realizar la reacción de ligamiento. El patrón electroforético obtenido antes y después de tratar la mezcla con DNA ligasa de T4 se muestra en la **Figura 16**.

Se realizó la transfección de la bacteria huésped BAL 31 con los genomas híbridos reconstituidos. La infectividad de estos genomas se determinó por el desarrollo de placas de lisis a 20°. En la **TABLA 2** está representado el número de placas de lisis obtenidas en dichas transfecciones.

Replicas de las placas de lisis obtenidas post transfección fueron incubadas a 20°C y 30°C durante toda la noche, para determinar cuáles de ellas presentaban el fenotipo silvestre, es

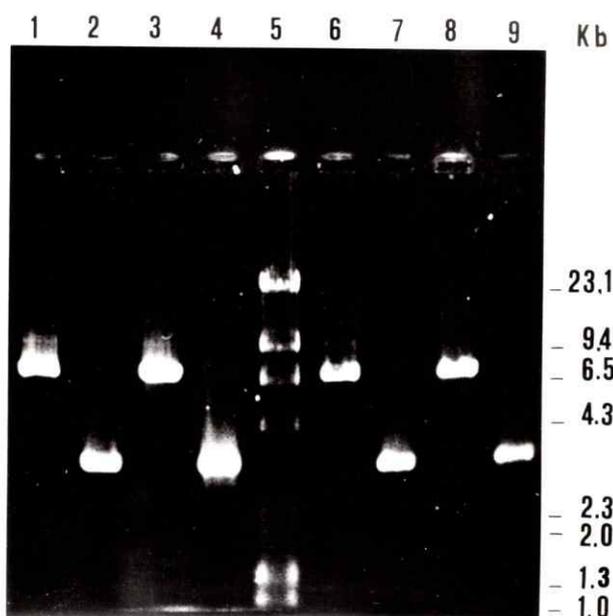
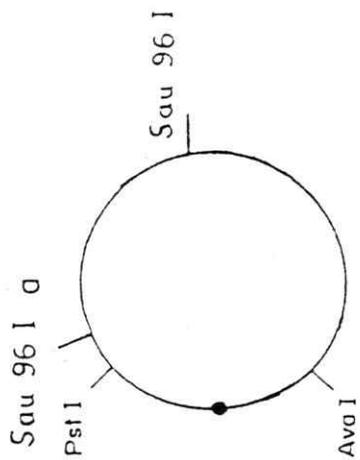


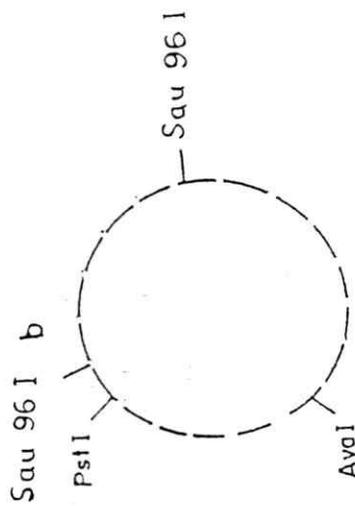
FIGURA 14 ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS FRAGMENTOS Sau 96I DEL DNA DE PM2 RECUPERADOS DE UN GEL DE BAJO PUNTO DE FUSION

El DNA de los fagos mutantes y silvestre fue digerido con la enzima Sau 96I, recuperados de un gel de agarosa de bajo punto de fusion y cargado en un gel de agarosa al 0,7 %. La electroforesis se realizò a 35 volt durante 3 h. Se usò como control DNA del fago lambda digerido con Hind III y DNA del fago ØX174 digerido con Hae III. Carriles 1 y 3: DNA del fragmento de 6,9 Kb del mutante ts71 y ts79; carriles 6 y 8: fragmento de 6,9 Kb de PM2 silvestre; carriles 2 y 4: DNA del fragmento de 3,6 Kb del mutante ts71 y ts79; carriles 7 y 9 fragmento de 3,6 Kb de PM2 silvestre; carril 5: DNA del fago lambda digerido con Hind III y del fago OX174 digerido con Hae III.

Genoma viral

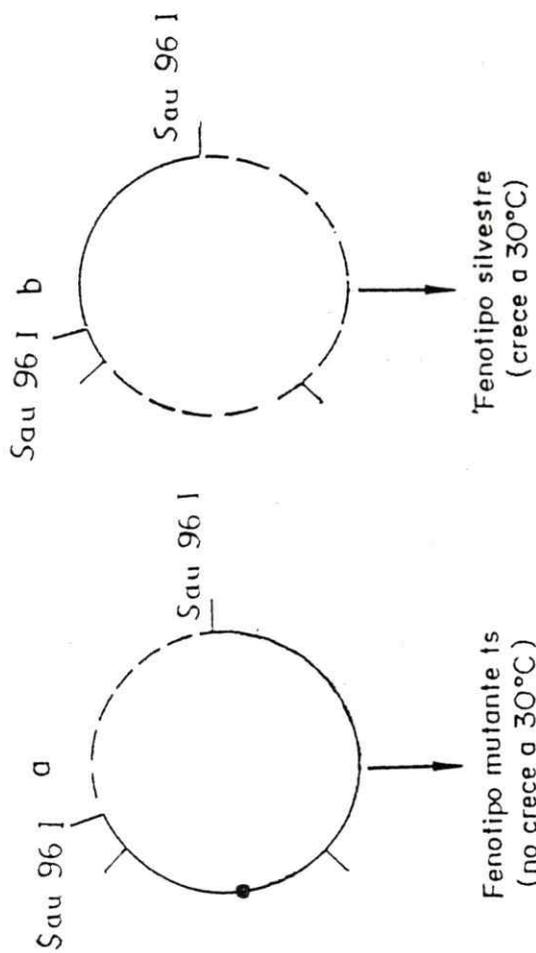


mutante *ts*



silvestre

Genoma viral reconstituido



Fenotipo mutante *ts*
(no crece a 30°C)

Fenotipo *silvestre*
(crece a 30°C)

FIGURA 15: Construcción de genomas virales híbridos entre fragmentos *Sau* 96 I y posterior localización de la mutación *ts* en el mapa físico viral.

- Sitio mutado que origina la mutación *ts*

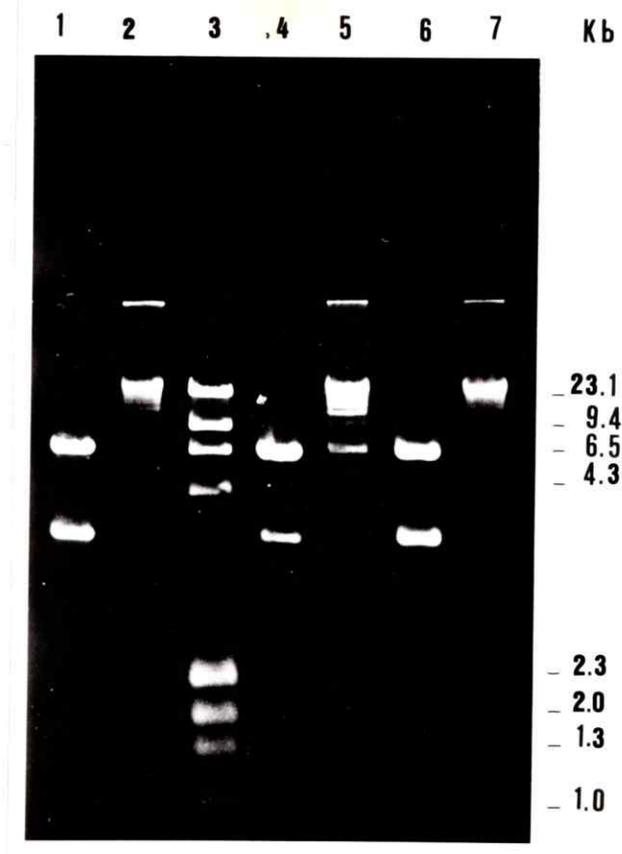


FIGURA 16 ANALISIS ELECTROFORETICO DE LA MEZCLA DE FRAGMENTOS Sau 96I MUTANTES Y SILVESTRE DE PM2 TRATADA CON DNA LIGASA DE T4.

Los fragmentos Sau96I de 6,9 y 3,6 Kb fueron mezclados y tratados a 14°C por 24 h con DNA ligasa de T4 y cargados en un gel de agarosa al 0,7 %. La electroforesis se realizó a 35 volt durante 3 h. Se usó como control cada una de las mezclas previo al tratamiento enzimático. Carril 1: fragmento de 6,9 Kb silvestre mezclado con el fragmento de 3,6 Kb silvestre; carril 3: DNA del fago lambda digerido con Hind III y DNA del fago ØX174 digerido con Hae III; carril 4: fragmento de 6,9 Kb silvestre mezclado con el fragmento de 3,6 Kb ts71; carril 6: fragmento de 6,9 Kb ts71 mezclado con el de 3,6 Kb silvestre; carriles 2, 5 y 7: la mezcla de los carriles 1, 4 y 6 tratada con DNA ligasa.

TABLA 2

ANALISIS FENOTIPICO DE PLACAS DE LISIS OBTENIDAS POR TRANSFECCION CON GENOMAS VIRALES HIBRIDOS

a) N° DE PLACAS DE LISIS OBTENIDAS EN TRES EXPERIMENTOS DE TRANSFECCION

b) N° DE CLONES QUE MOSTRARON BANDAS DE DNA VIRAL / N° DE CLONES

DNA viral hibrido	N° de placas de lisis	multiplicación a		DNA viral intracelular a 30°C
		20°C	30°C	
1.- 6,9 Kb ts71	3	3/3	3/3	2/2
2.- 3,6 Kb ts71	5	5/5	0/5	2/5
3.- wt + wt	0	0	0	0
4.- DNA de PM2 silvestre	163	9/9	9/9	2/2
5.- 6,9 Kb ts79	3	3/3	3/3	2/2
6.- 3,6 Kb ts79	8	8/8	0/8	1/4
7.- wt + wt	3	3/3	3/3	2/2
8.- DNA de PM2 Silvestre	13	4/4	4/4	3/3

decir, eran capaces de crecer a 20°C y 30°C y cuales el fenotipo ts, en este caso aquellas que no se multiplicaran a 30°C.

Los resultados obtenidos **TABLA 2** indican que el fenotipo ts se encuentra cuando el genoma viral híbrido está constituido por el fragmento de 3,6 Kb del fago mutante y el fragmento de 6,9 Kb del fago silvestre, pues en este caso los fagos híbridos son incapaces de crecer a 30°C.

Para determinar si existía síntesis de DNA viral intracelular después de infección a 30°C con los fagos progenie se procedió al análisis electroforético de células 35 min post infección a 30°C. En la **Figura 17**, carriles 6 y 7 se observa el patrón de bandas obtenido cuando el genoma estaba constituido por los fragmentos de 6,9 Kb Sau 96I ts y el fragmento de 3,6 Kb Sau 96I silvestre, el que fue similar al obtenido en la infección con DNA silvestre (carril 9). En los carriles 2 al 5, esta el patrón de bandas cuando el genoma híbrido estaba constituido por los fragmentos de 3,6 Kb Sau 96I ts y 6,9 Kb Sau 96I silvestre. Como se puede observar en tres de los casos analizados carriles 2, 3 y 4, las bandas de DNA viral fueron escasamente visibles, incluso comparables con el control de células sin infectar (carril 1). Sin embargo en algunos casos se obtuvo un patrón de bandas similar al de una infección de tipo silvestre (**Figura 17**, carril 5). Llama la atención que lo mismo haya sucedido con los dos mutantes de PM2 ts71 y ts79.

En la **TABLA 2** están registrados los datos correspondientes

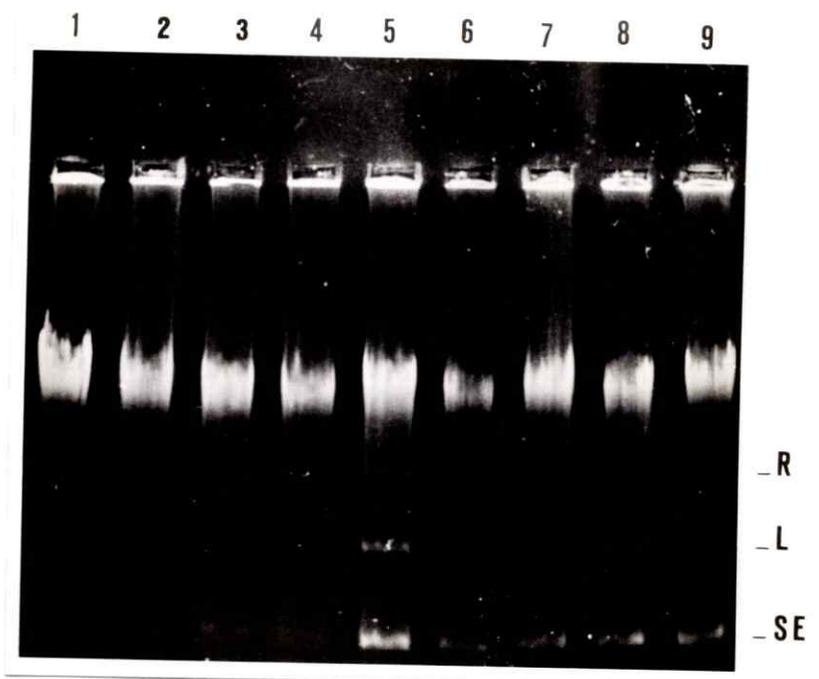


FIGURA 17 ANALISIS ELECTROFORETICO DEL DNA VIRAL SINTETIZADO A 30°C POR FAGOS CON DNA HIBRIDO.

Se infectaron células BAL31 con las diferentes mezclas de fragmentos tratadas con DNA ligasa y se usó como control células sin infectar y células infectadas con DNA del fago silvestre. Posteriormente las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0,7 %. La electroforesis se realizó a 35 volt durante 5 h. Carril 1: células no infectadas; carriles 2-8: células infectadas con fago con genoma: 6,9 Kb silvestre + 3,6 Kb ts79 (carriles 2, 3, 4 y 5); 6,9 Kb ts79 + 3,6 Kb silvestre (carriles 6 y 7); 6,9 Kb silvestre + 3,6 Kb silvestre (carril 8); carril 9: células infectadas con fago silvestre.

Formas de DNA viral; R: circular relajada; SE: circular sobreenrollada y L: lineal.

a la detección de DNA viral intracelular a 30°C, considerando los genomas híbridos con el DNA de ambos mutantes ts71 y ts79.

Los resultados del fenotipo de la progenie obtenida después de transfección con estos genomas híbridos indican que la mutación ts en el gen de replicación del bacteriófago PM2 se encuentra ubicada en fragmento de 3,6 Kb Sau 96I del DNA de PM2. Por consiguiente, podemos que esta ubicada en el fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI y dentro de este fragmento estaría en aquella porción del fragmento de 7,5 Kb PstI-AvaI que comprende parte del fragmento HindIII-1. Como se muestra en la **Figura 3**

IV DISCUSION

El problema planteado de ubicar dos mutaciones termosensibles en replicación del bacteriófago PM2 en el mapa físico viral fue abordado con un diseño experimental que contempló la construcción de genomas virales híbridos entre fragmentos mutantes y silvestres de PM2. La construcción de estos genomas se enfrentó mediante dos alternativas; la primera por obtención de plásmidos recombinantes que llevaran como inserto el genoma total o fragmentos del DNA de PM2 mutantes y silvestres, a partir de los cuales se facilitaría la obtención del o de los fragmentos PstI-AvaI o bien del genoma total de PM2. La alternativa era construir los genomas virales híbridos directamente a partir de DNA viral de los dos mutantes y del fago silvestre. En ambos casos la localización de las mutaciones se determinaría mediante análisis de la progenie obtenida después de transfección de BAL31.

Cuando se realizaron experimentos de transfección de BAL31 con DNA silvestre proveniente de uno de los plásmidos híbridos (pPM31) no se obtuvieron centros infectivos a pesar de haber repetido el experimento en tres oportunidades. Cabe señalar que en cada una de las experiencias se demostró que las células estaban en estado de competencia usando en la transfección DNA viral silvestre como control, pero la eficiencia fue menor que lo esperado para la concentración de DNA utilizada. Teniendo en

consideración lo anterior, se fue aumentando en cada uno de los experimentos la concentración de DNA de PM2 recuperado de pPM31 pero los resultados tampoco fueron positivos. Quizás nuevos intentos de transfectar con DNA de PM2 proveniente de plásmidos híbridos deberán estar circunscritos a definir la concentración de DNA y obtener esferoplastos en un mejor estado de competencia. Los resultados de esta tesis tal vez podrían indicar la existencia de un sistema de restricción/modificación que no ha sido descrito en BAL31 pero hacen falta otros antecedentes para realizar tal aseveración; por ejemplo intentar incorporar en BAL31 DNA viral que previamente haya pasado por *E. coli*, usando otros métodos como el de electroporación (33). Es importante mencionar que si bien los plásmidos híbridos obtenidos no fueron utilizados para cumplir nuestro objetivo adquieren relevancia puesto que llevan clonado el fragmento que lleva el origen de replicación de PM2 y en investigaciones futuras pueden servir como sustrato in vitro para la endonucleasa sitio-ori específica e incluso si se determina la secuencia nucleotídica de dicho fragmento, identificar la secuencia específica reconocida por dicha enzima. De hecho nosotros hemos ya secuenciado un fragmento PstI-AvaI de 50 pb y otro de 460 pb, ambos subfragmentos del fragmento Hind III-4 (experimentos no mostrados).

Por otra parte habiendo estandarizado en el laboratorio la transfección de BAL31 con DNA proveniente directamente del fago,

se procedió a la construcción de genomas virales híbridos a partir del genoma viral lo que por un lado resultó ventajoso dado que no es necesario clonar, transformar y seleccionar posibles clones, procesos que demandan tiempo. Por otro lado, tiene la desventaja de que no se cuenta con un stock del cual se puedan obtener fácil y rápidamente los fragmentos o el genoma viral total.

Para nuestro estudio la estrategia de generar genomas híbridos a partir del DNA viral fue de gran utilidad puesto que se logró transfectar con estos genomas y se obtuvieron placas de lisis a partir de las cuales se estableció la naturaleza mutante o silvestre de la progenie viral, lo que permitió ubicar las mutaciones ts en replicación para los dos mutantes ts71 y ts79 en el mapa físico viral. Nuestros resultados con los fragmentos PstI-AvaI asignaron el fenotipo mutante al genoma híbrido constituido por el fragmento de 7,5 Kb mutante y 2,5 Kb silvestre puesto que fagos con dicha constitución fueron incapaces de crecer a 30°C. Era importante demostrar a continuación, si realmente estos genomas con fenotipo ts eran defectivos en replicación al igual que los genomas ts de los cuales ellos provenían. Los resultados del análisis electroforético del DNA viral sintetizado a 30°C 35 min post infección demostraron que no se detectaba DNA viral intracelular en la progenie viral con fenotipo mutante ts. En cambio, sí se observó cuando el fenotipo de la progenie era silvestre. Por lo tanto, concluimos que las dos mutaciones ts en replicación del bacteriófago PM2 se ubicaban

en el fragmento PstI-AvaI de 7,5 Kb, es decir distante del origen de replicación. Esto le da a este sistema una nueva característica quizás única en el modelo de círculo rotatorio y tal vez está dando la pauta para comenzar a secuenciar dicho fragmento.

Finalmente, logramos localizar las dos mutaciones ts en el fragmento Sau 96I de 3,6 Kb. En este caso cabe hacer notar que, aunque en el 100 % de los casos en que el genoma estaba constituido por el fragmento de 3,6 Kb mutante y el de 6,9 Kb silvestre no hubo progenie viral en condiciones restrictivas, para nuestra sorpresa con algunos genomas híbridos con fenotipo ts se detectó síntesis de DNA viral intracelular. Es importante mencionar que cuando se quiso verificar en esta progenie viral con fenotipo ts la capacidad de sintetizar DNA en condiciones restrictivas, utilizando en la transfección fagos provenientes del mismo lisado en ciertas oportunidades no se detectó síntesis de DNA viral intracelular y en otras sí tanto en ts71 como en ts79. Una explicación de lo observado podría ser que la digestión del DNA de PM2 con Sau 96I generara, en algunos casos extremos que modificaran el grado de la mutación y por lo tanto la intensidad de la termosensibilidad variara. Esta explicación podría ser rebatida por el hecho de que en las diferentes oportunidades en que se infectó para verificar el fenotipo ts en replicación del DNA, la experiencia se realizó con una población de fagos provenientes del mismo lisado el cual había sido originado a partir de una placa de lisis aislada post

transfección y que por lo tanto constituía un clon. Nos parece también sorprendente que lo que sucedió con algunos fagos mutantes sólo se dio cuando la combinación de genoma híbrido llevaba el fragmento de 3,6 Kb proveniente del ts y tanto para ts71 como para ts79.

A pesar que experimentos de síntesis de DNA viral con los genomas híbridos Sau 96I no fueron reproducibles es importante destacar que, al considerar la totalidad de los casos, en 6 de 9 no hubo síntesis de DNA viral, es decir aproximadamente en 66% de los casos estudiados hubo correspondencia entre el fenotipo ts y la ausencia de síntesis de DNA viral en condiciones restrictivas, lo que nos hizo asignar dichas mutaciones en el fragmento Sau 96I de 3,6 Kb.

La importancia de haber acotado la localización de las dos mutaciones al fragmento Sau 96I de 3,6 Kb es que su menor tamaño permite secuenciarlo con mayor facilidad y se podría calcular el peso molecular de la proteína codificada lo que facilitaría su purificación. El otro aporte interesante del presente estudio es que suministra un punto de referencia entre el mapa físico y genético de PM2 a partir del cual se puede facilitar, en estudios posteriores, una correlación entre dichos mapas al establecer la ubicación de otro gen. Además, el hecho de haber localizado las dos mutaciones ts en una región lejana al origen de replicación de PM2, que no concuerda con lo predicho de acuerdo a la literatura existente plantea una interrogante con respecto al sistema de replicación de PM2; específicamente, cuánto se

diferencia de aquellos sistemas ya descritos que replican bajo el mecanismo de circulo rotatorio.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Alonso, A.; Venegas, A.; Vicuña, R.; Yudelevich, A.; Canelo, E.; and Zaldivar, M. (1981). The genome of bacteriophage PM2: Cloning, restriction endonuclease map and characterization of temperature-sensitive mutants. *Molecular Approaches to Gene expression and Protein Structure*. Ed. Siddiqui, Krauskopf, Weisback. Acad. Press, New York, 87-107.
2. Alonso, A.; Medina, A.; Vicuña, A.; Valenzuela, P., and Yudelevich, A. (1981). Molecular cloning and physical map of bacteriophage PM2 DNA. *Gene* 13: 115-118.
3. Baas, P. (1985). DNA replication of single-stranded *Escherichia coli* DNA phages. *Biochim. Biophys. Acta* 825: 111-139.
4. Brack, C.; Eberle, M.; Bickle, T. and Youan, R. (1976). A map of the sites on the bacteriophage PM2 DNA for the restriction endonucleases Hind III and Hpa II. *J. Mol. Biol.* 101: 305-309.
5. Brewer, G. and Singer, S. (1974). On the disposition of the proteins of the membrane-containing bacteriophage PM2. *Biochemistry* 13: 3588-3589.
6. Brewer, G. (1978). Characterization of temperature-sensitive mutants of bacteriophage PM2: Membrane mutants. *Mol. Gen. Genet.* 167: 65-74.
7. Brewer, G. (1980). Control of membrane morphogenesis in bacteriophage. *Int. Rev. Cytol.* 68: 53-95.
8. Canelo, E.; Phillips, O. and Nicolau del Roure, N. (1985). Relating cistrons and functions in bacteriophage PM2. *Virology* 140: 364-367.
9. Cota-Robles, E.; Espejo, R. and Williams, P. (1968). Ultrastructure of bacterial cells infected with bacteriophage PM2, a lipid-containing bacterial virus. *J. Virol.* 2: 56-68.

10. Eisenberg, S.; Griffith, J. and Kornberg, A. (1977). ϕ X174 Cistron A protein is a multifunctional enzyme in DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3198-3202.
11. Espejo, R. and Canelo, E. (1968). Properties of bacteriophage PM2: A lipid-containing bacterial virus. Virology 34: 738-747.
12. Espejo, R.; Canelo, E. and Sinsheimer, R. (1968). Properties and characterization of the host bacterium of bacteriophage PM2. J. Bacteriol. 95: 1887-1891
13. Espejo, R.; Canelo, E. and Sinsheimer, R. (1969). DNA of bacteriophage PM2: A closed circular double-stranded molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63: 1164-1168.
14. Espejo, R.; Canelo, E. and Sinsheimer, R. (1971). Replication of bacteriophage PM2 deoxyribonucleic acid: A closed circular double-stranded molecule, J. Mol. Biol. 56: 597-621.
15. Espejo, R.; Canelo, E. and Sinsheimer, R. (1971). A difference between intracellular and viral supercoiled PM2 DNA. J. Mol. Biol. 56: 623-626.
16. Fluit, A.; Baas, P.; Van Boom, J.; Veeneman, G. and Jansz, Z. (1984). Gene A protein cleavage of recombinant plasmids containing of ϕ X174 replication origin. Nucl. Acids Res 12: 6443-6454.
17. Gilbert, W. and Dressler D. (1968). DNA Replication: the rolling circle model. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 473-484.
18. Gruss, A.; Ross, H. and Novick, R. (1987). Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2165-2169.

19. Ikeda, J.; Yudelevich, A. and Hurwitz, J. (1976). Isolation and characterization of the protein coded by gene A of bacteriophage OX174 DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 2669-2673.
20. Koepsel, R.; Murray, R.; Rosenblum, W. and Khan, S. (1985). The replication initiator protein of plasmid pT181 has sequence-specific endonuclease and topoisomerase-like activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6845-6849.
21. Kolonder, R. and Tewari, K. (1975). Chloroplast DNA from higher plants replicates by both the Cairns and the rolling circle mechanism. Nature 256: 708-711.
22. Lewin, B. (1987). Genes III, 3ra Edición. Ed. John Wiley & Sons.
23. López, E. (1989). Clonamiento del DNA del bacteriófago PM2. Tesis para optar al título de Licenciado en Educación especialidad de Química y Biología. U. de Santiago de Chile.
24. Manch-Citron, J.; Gennaro, M.; Majunder, S. and Novick, R. (1986). RepC is rate limiting for pT181 plasmid replication. Plasmid 16: 108-115.
25. Manfeld, A.; Teeffelen, H.; Baas, P.; Veeneman, G.; Van Boom, J. and Jansz, H. (1984). The bond in the bacteriophage OX174 gene A protein-DNA complex is a tyrosyl-5-phosphate ester. FEBS Lett. 173: 351-356.
26. Marcoli, R.; Pirotta, V. and Franklin, R. (1979). Interactions between bacteriophage PM2 protein IV and DNA. J. Mol. Biol. 131: 107-131.
27. Meyer, T. F.; Geider; Kurz and Schaller. (1979). Cleavage site of bacteriophage fd gene II-protein in the origin of viral strand replication. Nature 278: 365-367.
28. Meyer, T. and Geider, K. (1979). Bacteriophage fd Gene II-Protein. J. Biol. Chem. 254: 12636-12641.

29. Novick, R. P. (1989). Staphylococcal plasmids and their replication. *Ann. Rev. Microbiol.* 43: 537-565.
30. Novick, R.; Adler G.; Majumder.; S. Khan.; S. Carleton.; S. Roseblum, W. and Yordanescu, S. (1982). Coding sequence for the pT181 repC product: A plasmid-coded protein uniquely required for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 4108-4112.
31. Peeters, B.; Schoenmakers, J. and Koings, R. (1986). The gene II proteins of the filamentous phages IKE and Ff(M13, fd y f1) are not functionally interchangeable during viral strand replication. *Nucl. Acids Res* 14: 5067-5073.
32. Rempola, B. and Fikus, M. (1979). Cloning of bacteriophage PM2 DNA in *E. coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 176: 433-438.
33. Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition.* Cold Sprig Harbor Laboratory Press.
34. Schöder, C. and Kaerner, H. (1972). Replication of bacteriophage OX174 replicative form DNA in vivo. *J. Mol. Biol.* 71: 351-362.
35. Sheflin, L. and Kowalski, D. (1984). Mung bean nuclease cleavage of a dA+dT rich sequence or an inverted repeat sequence in supercoiled PM2 DNA depends on ionic environment. *Nucl. Acids Res* 12: 7078-7104.
36. Urquiaga, I.; Venegas, A. y Yudelevich, A. (1982). Estructura del genoma del bacteriófago PM2: Mapa físico, clonamiento molecular y origen de replicación. *Arch. Biol. Med. Exp.* 15: 407-416.
37. Urquiaga, I.; Alonso, A.; Valenzuela, P.; Venegas, A.; Vicuña, R. and Yudelevich, A. (1981). The genome of bacteriophage PM2: Cloning, restriction endonuclease map and origin of replication. *Arch. Biol. Med. Exp.* 14: 196.

38. Van Der Schans, G.; Weyermans, J. and Bleichhrodt, J. (1971). Infection of spheroplasts of *Pseudomonas* with DNA of bacteriophage PM2. *Mol. Gen. Genet.* 110: 263-271.
39. Venegas, A.; Urquiaga, I.; Vicuña, R. y Yudelevich, R. (1981). Localización y caracterización preliminar del origen de replicación del bacteriófago PM2. *Arch. Biol. Med. Exp.* 14: 301.
40. Zock, J. M.; Buch, P. and Khan, S. A. (1990). Specificity of repC protein in plasmid pT181 DNA replication. *J. Biol. Chem.* 265: 3484-3488.