

UCH-FC  
DOC-B  
L 177  
C.1

PROPAGACION DEL BACTERIOFAGO P4 COMO UN PLASMIDIO

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología

por

ROSA ALBA LAGOS MONACO

1985



Director de Tesis: DR. RICHARD GOLDSTEIN

Profesor Patrocinante: DR. TITO URETA

Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

I N F O R M E   D E   A P R O B A C I O N

T E S I S   D E   D O C T O R A D O

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la Candidata

Rosa Alba L. Lagos Mónaco

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 de Octubre de 1985.

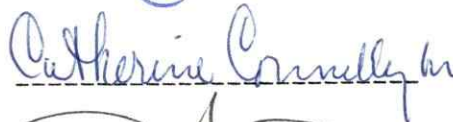
Patrocinante de Tesis:  
Dr. Tito Ureta



Director de Tesis:  
Dr. Richard Goldstein



Comisión Informante de Tesis:  
Dra. Catherine Connelly



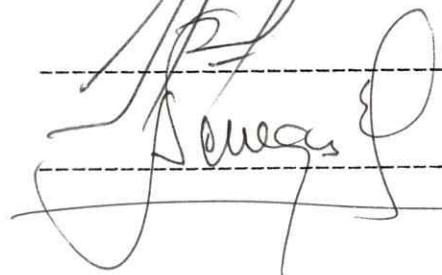
Dr. Carlos Jerez



Dr. Eugenio Spencer



Dr. Alejandro Venegas



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Microbiología y Genética Molecular, Harvard Medical School, bajo la dirección del doctor Richard Goldstein.



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a las siguientes personas:

Al Dr. Richard Goldstein, por su guía, su constante apoyo, y por su amistad.

Al Dr. Tito Ureta, por patrocinar esta tesis, y por brindarme su ayuda en los momentos necesarios.

A los miembros del Departamento de Microbiología y Genética Molecular, Harvard Medical School, en especial a los Dres. Jon Beckwith, Roberto Kolter y Dan Fraenkel por sus sugerencias en diferentes etapas de esta tesis.

A Seung Kim, Paula Lozano, Ru-Zhang Jiang y Vernard Coulter, del Laboratorio del Dr. R. Goldstein por su colaboración en diversos aspectos de esta tesis.

Al Dr. Octavio Monasterio, por la elaboración de un programa de computación para los caracteres especiales usados en la escritura de esta tesis.

A Victoria Guixé, por sus comentarios acerca de esta tesis.

A Cecilia Fernández por la confección de algunos de los dibujos, y a Ladislao Monasterio por las fotografías.

Rosalba Lagos Mónico





A mi madre

A mi esposo

A mi hijo



## INDICE DE MATERIAS

	Fág
LISTA DE TABLAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xviii
INTRODUCCION .....	1
<i>Caracterización inicial de P4</i> .....	1
<i>Funciones genéticas codificadas por P4 y su relación con P2</i> .....	2
<i>Replicación de P4 en ausencia de P2</i> .....	7
<i>Exposición del problema</i> .....	7
MATERIALES Y METODOS .....	12
REACTIVOS .....	12
CEPAS DE FAGOS Y BACTERIAS .....	12
MEDIOS DE CULTIVO .....	13
PURIFICACION Y CRECIMIENTO DE FAGOS .....	20
CONSTRUCCION DE CEPAS QUE LLEVAN EL PLASMIDIO P4 .....	21
SELECCION DE CLONES PUTATIVOS QUE PORTAN pP4 EN FORMA ESTABLE .....	22
DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS DEL PLASMIDIO .....	23
DETERMINACION DE SINTESIS TOTAL DE DNA .....	24
ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA .....	24
AISLAMIENTO DE DNA DE PLASMIDIO .....	25
PREPARACION DE DNA TOTAL .....	26



DIGESTION DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCION .....	27
TRANSFERENCIA DE DNA DESDE BELES DE AGAPOSA A FILTROS DE NIROCELULOSA, E HIBRIDACION CON DNA DE P4 .....	28
DETERMINACION DE LISIS CELULAR DESPUES DE INFECTAR CELULAS PORTADORAS DE pP4 Y SUS DERIVADOS CON P2 .....	31
EXPERIMENTOS DE EXPLOSION DE FAGOS .....	31
SEPARACION DE LOS FAGOS P2 Y P4 MEDIANTE GRADIENTES ISOPICNICAS DE CsCl .....	32
ANALISIS DE LA SINTESIS DE PROTEINAS DE pP4 .....	33
TRANSFORMACION CON DNA DE PLASMIDIO .....	35
ENSAYO DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASICA .....	36
TRANSDUCCION CON EL FAGO P1 .....	37
RESULTADOS .....	38
PROPIEDADES BASICAS DEL PLASMIDIO P4 .....	38
<i>Determinación del número de copias de pP4</i> .....	38
<i>Papel del producto génico <math>\alpha</math> sobre la mantención de pP4</i> .....	46
<i>Localización de pP4vir1xts61 en un huésped crecido a 42°C</i> .....	48
<i>Inducción del profago P4vir1xts61 al estado de plasmidio</i> .....	52
<i>Inhibición de la replicación del DNA por cloramfenicol y rifampicina</i> .....	53
<i>Funciones celulares que afectan la replicación de pP4</i> ..	57
<i>Replicación del DNA del plasmidio y cromosomal bajo condiciones no permisivas de las mutantes dna</i> .....	62
FUNCIONES DE P4 QUE AFECTAN LA MANTENCION DEL PLASMIDIO .	69
<i>La variación del número de copias por las condiciones de crecimiento está bajo el control genético de pP4</i> .....	78
<i>La integración de P4 en el cromosoma bacteriano es necesaria para la propagación estable de pP4</i> .....	89

EXPRESION DE LOS PRODUCTOS GENICOS DEL PLASMIDIO P4 .....	98
<i>Fisiología de pP4 en presencia de P2 .....</i>	98
<i>Análisis de la expresión de los productos génicos producidos por pP4 .....</i>	109
<i>Efecto de mutaciones en el factor rho en la mantención de pP4 .....</i>	114
<i>pP4 codifica para una función antiterminadora de la transcripción .....</i>	123
DISCUSION .....	135
<i>Propiedades básicas de pP4 .....</i>	136
<i>Uso de pP4 como un vector de clonamiento .....</i>	142
<i>Funciones de P4 que afectan la mantención del plasmidio</i>	145
<i>Expresión génica del plasmidio P4 .....</i>	149
<i>Identificación de un antiterminador codificado por P4 que antagoniza con la terminación de la transcripción mediada por rho .....</i>	152
<i>Comentario final .....</i>	154
BIBLIOGRAFIA .....	155

LISTA DE TABLAS

	Pág
TABLA-ESQUEMA 1. <i>Propiedades relevantes de algunas funciones codificadas por P4</i> .....	3
TABLA A. <i>Cepas bacterianas</i> .....	14
TABLA B. <i>Cepas de fagos</i> .....	17
TABLA I. <i>Efecto del cloramfenicol y rifampicina sobre la replicación de pP4 in vivo</i> .....	56
TABLA II. <i>Efecto de mutaciones en las funciones dnaA, B, G y E sobre la replicación de pP4</i> .....	65
TABLA III. <i>Efecto de mutaciones de P4 sobre la estabilidad y número de copias de pP4 sus derivados</i> .....	90
TABLA IV. <i>Tamaño de explosión de P2 y P4 como medida de las funciones de transactivación y supresión de polaridad en células que llevan pP4</i> .....	104
TABLA V. <i>Tamaño de explosión de P2 y P4 en la cepa C1a(pP4vir1) infectada con P2</i> .....	108
TABLA VI. <i>Cinética del número de copias después de infectar la cepa C3103 con P4vir1</i> .....	113
TABLA VII. <i>Efecto del alelo rho102 en la mantención de pP4</i> .....	115
TABLA VIII. <i>Cinética del número de copias de pP4 después de la infección en un huésped que porta el alelo rho102</i> .....	117
TABLA IX. <i>Expresión de los productos génicos psu y sid por mutantes de P4</i> .....	127
TABLA X. <i>Expresión de la <math>\beta</math>-galactosidasa como medida de la terminación de la transcripción en el terminador del operón del triptófano</i> .....	130
TABLA XI. <i>Medida de la <math>\beta</math>-galactosidasa como expresión del gen psu clonado en pBR325</i> .....	133



LISTA DE FIGURAS

	Pág
Fig. 1. <i>Análisis de las formas de DNA de las cepas Cla y Cla(P4wt) mediante centrifugación al equilibrio en CsCl</i> .....	39
Fig. 2. <i>Alteraciones en las condiciones de crecimiento permiten un control inducible del número de copias de pP4</i> .....	41
Fig. 3. <i>El número de copias de pP4 es dependiente de la temperatura</i> .....	43
Fig. 4. <i>Efecto de cAMP sobre el número de copias de pP4</i> .....	45
Fig. 5. <i>La replicación de pP4<sub>otsb1vir1</sub> es dependiente de la temperatura</i> .....	47
Fig. 6. <i>Mapa de restricción de P4 con la enzima EcoRI...</i>	49
Fig. 7. <i>Hibridación por el método de Southern del DNA total digerido con EcoRI de células que portan pP4</i> .....	51
Fig. 8. <i>El cambio de temperatura desde 42°C a 37°C induce la forma integrada de P4<sub>otsb1vir1</sub> al estado de plasmidio</i> .....	54
Fig. 9. <i>Inhibición de la replicación de pP4 por cloramfenicol y rifampicina</i> .....	55
Fig. 10. <i>Síntesis de DNA total en cepas defectivas en funciones dna que portan pP4</i> .....	59
Fig. 11. <i>Efecto de la temperatura sobre la síntesis de pP4 en cepas termosensibles en las funciones dnaA y B</i> .....	63
Fig. 12. <i>Efecto de la temperatura sobre la síntesis de pP4 en cepas termosensibles en las funciones dnaG y E</i> .....	67
Fig. 13. <i>Número de copias de mutantes derivadas de pP4 ..</i>	71
Fig. 14. <i>Cinética del número de copias de la forma superenrollada de P4<sub>vir1</sub> después de la infección</i> .....	73

Fig. 15.	<i>Cinética del número de copias de la forma superenrollada de P4psulvir1 después de la infección</i>	74
Fig. 16.	<i>Mutantes P4<math>\delta</math>inv9vir1 y P4<math>\delta</math>inv11vir1 construidas in vitro en las cuales se ha rearmado el circuito génico psu-<math>\delta</math>-sid</i>	76
Fig. 17.	<i>Determinación del número de copias de mutantes derivadas de pP4</i>	77
Fig. 18.	<i>Determinación semicuantitativa del número de copias de pP4, mediante electroforesis en geles de agarosa</i>	80
Fig. 19.	<i>Determinación semicuantitativa del número de copias de mutantes derivadas de pP4 crecida bajo diferentes condiciones, mediante electroforesis en agarosa</i>	81
Fig. 20.	<i>C1a(pP4<math>\delta</math>inv9vir1) crecida bajo diferentes condiciones</i>	82
Fig. 21.	<i>Efecto de cAMP sobre el número de copias de C1a(pP4<math>\delta</math>inv9vir1)</i>	84
Fig. 22.	<i>Hibridación del DNA total de mutantes derivadas de pP4 digerido con EcoRI por el método de Southern</i>	85
Fig. 23.	<i>Hibridación del DNA total de mutantes derivadas de pP4 digerido con EcoRI por el método de Southern</i>	86
Fig. 24.	<i>Mapa genético y de restricción del plásmido P4</i>	87
Fig. 25.	<i>Análisis de los clones que portan fragmentos EcoRI de pP4 y kanamicina</i>	91
Fig. 26.	<i>Determinación de la orientación y posición del fragmento kanamicina de los derivados de pP4vir1-Km mediante digestión con la enzima HindIII</i>	93
Fig. 27.	<i>Hibridación del DNA total de mutantes derivadas de pP4 con delecciones de los fragmentos B y C de EcoRI por el método de Southern</i>	95
Fig. 28.	<i>Estructura transcripcional de los operones policistronicos de los genes tardíos del fago P2</i>	99



Fig. 29.	<i>Lisis celular como medida de la expresión de las funciones de transactivación y supresión de polaridad de pP4</i> .....	102
Fig. 30.	<i>Perfiles de gradientes en CsCl de los lisados celulares de Cl(pP4vir1) y mutantes derivadas infectadas con P2vir1</i> .....	106
Fig. 31.	<i>Expresión de los productos génicos de pP4 medida a través de marcación con [<sup>35</sup>S]-metionina</i> .....	111
Fig. 32.	<i>Determinación semicuantitativa del número de copias de mutantes de P4 establecidas en la cepa C3104, defectiva en el alelo rho102, mediante electroforesis en geles de agarosa</i> .....	119
Fig. 33.	<i>Número de copias de la cepa C3104(pP4<math>\phi</math>104vir1) (defectiva en el alelo rho102) crecida bajo diferentes condiciones</i> .....	120
Fig. 34.	<i>Determinación semicuantitativa del número de copias de pP4 y mutantes derivadas establecidas en la cepa C1844 (suA) mediante electroforesis en geles de agarosa</i> .....	122
Fig. 35.	<i>La región trp-lac de la cepa de E. coli X8605</i> .....	125
Fig. 36.	<i>Construcción de los derivados de pP4vir1 EcoRI:AD-Km</i> .....	126
Fig. 37.	<i>Determinación de la orientación del fragmento que lleva el gen de resistencia a kanamicina en los derivados de pP4vir1 EcoRI:AD-Km</i> .....	128
Fig. 38.	<i>Mapa de restricción de pP4</i> .....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	: Adenosina 5' monofosfato
ATP	: Adenosina 5' trifosfato
BSA	: Seroalbúmina de bovino
cAMP	: Adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
dATP	: desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP	: desoxicitidina 5' trifosfato
dGTP	: desoxiguanosina 5' trifosfato
dTTP	: desoxitimidina 5' trifosfato
DNA	: Acido desoxirribonucleico
DTT	: ditionitrosito
EDTA	: Acido etilendiaminotetracético
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminometano
RNA	: Acido ribonucleico

## RESUMEN

El virus satélite P4 ha sido clasificado como un bacteriófago defectivo, pues depende de otro virus, el colifago P2, para su desarrollo lítico. P2 provee las funciones de lisis celular y morfogenéticas necesarias para el ensamblaje de la cabeza y cola de P4. Una mutación espontánea única de P4, denominada *vir1*, permite su propagación como plasmidio, al mismo tiempo que una copia de P4 es integrada dentro del cromosoma bacteriano. La doble característica de fago y plasmidio hacen este sistema muy atractivo, por su uso potencial como vector de clonamiento, y porque permite estudiar la regulación de P4 en ausencia de P2. El objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades generales de P4 como plasmidio (pP4), tales como su número de copias, modo de replicación y su estabilidad; y se propuso además analizar las propiedades del sistema pP4, como son la expresión de los productos génicos de pP4 y las funciones de P4 necesarias para la mantención del plasmidio.

Se encontró que el número de copias de pP4 depende de las condiciones de crecimiento de la bacteria. Células crecidas en medio LB (Luria Broth) con glucosa y oxigenación a 37°C, presentan un número alto de copias (30 a 40 por cromosoma equivalente). La ausencia de glucosa, falta de oxigenación y temperaturas de crecimiento de 30°C disminuyen el número de copias a 1-2. Se demostró que el efecto de las condiciones de crecimiento sobre el número de copias de pP4 es producido a nivel de la replicación del DNA, y es una propiedad genética de P4. Esto último se demostró con una mutante construida *in vitro*, P4 $\Delta$ *inv9vir1*, la cual

perdió la dependendencia del número de copias por las condiciones de crecimiento, encontrándose invariablemente un número alto de copias.

La replicación de pF4 se analizó desde dos aspectos: funciones de pF4 necesarias para su replicación, y funciones del huésped necesarias para la replicación del plasmidio. El producto génico  $\alpha$  que corresponde a una primasa putativa, es necesario para la replicación de pF4. Se usó una mutante termosensible de F4 en  $\alpha$ , encontrándose que a temperaturas no permisivas (42°C) no hay replicación del plasmidio. La copia integrada en el cromosoma se mantiene en las condiciones no permisivas, y el plasmidio puede ser reinducido al cambiar las células a la temperatura permisiva (37°C). Por otra parte, usando mutantes condicionales letales *dna* *ts*, se encontró que el plasmidio no necesita las funciones *dnaA*, *dnaB*, *dnaE* implicadas en la iniciación de la replicación del DNA, pero si necesita del gen *dnaE*, que codifica para una subunidad de la DNA polimerasa III.

Se determinó que para mantener pF4 en forma estable, es necesaria la integración de una copia de F4 dentro del cromosoma bacteriano. Este es el primer caso descrito en que el mecanismo de estabilidad de un plasmidio requiere una copia "maestra" en el cromosoma bacteriano. Se construyó un derivado de F4, ligando un gen que confiere resistencia a kanamicina al fragmento AD de *EcoRI*, el cual contiene las funciones necesarias para la replicación de F4, y el sitio *att*, donde ocurre la recombinación con el cromosoma bacteriano. Sin embargo, este derivado es defectivo en integración, pues carece del gen *int*. Este plasmidio puede mantenerse indefinidamente en número alto de copias sólo en



presencia de kanamicina. Cuando este agente selectivo era retirado del medio, el plasmidio segregaba, curándose las células de P4. Experimentos de complementación mostraron que cuando se fuerza la integración de este derivado de P4, este plasmidio es mantenido en forma estable en ausencia del agente selectivo.

Se estudió la expresión génica de pP4 en presencia y ausencia de P2. En el primer caso, se hicieron pruebas fisiológicas infectando con P2 y mutantes de P2 las cepas que llevan pP4. Se encontró que pP4 podía suprimir polaridad (función *psu*), transactivar a P2 (función  $\delta$ ) y dirigir la formación de cápsides pequeñas (función *sid*), pero que no interfería con el desarrollo lítico de P2 (lo cual había sido observado en el fago P4). Esto llevó a pensar que existía una expresión génica diferente a la observada en el fago. Se examinaron los niveles de los productos génicos de pP4 en ausencia de P2, para lo cual se construyó la cepa que lleva el plasmidio en un huésped *uvrA*. Al irradiar las células con luz ultravioleta el nivel de síntesis de proteínas bacteriana disminuye en un grado mayor que la del plasmidio. Los productos génicos de pP4 se detectaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de un extracto marcado con [<sup>35</sup>S]-metionina. A diferencia de lo observado en el fago, las proteínas  $\alpha$  (primasa) y *psu* no son detectables, y la proteína *sid* está en cantidades bajas. Los niveles de la proteína 2, que es no esencial para el desarrollo lítico de P4, son altos, comparables a los encontrados en la infección viral. La disminución o carencia de *psu* en el sistema pP4, es predecible en un modelo en que esta proteína actúa como un antiterminador de la transcripción.

Las proteínas *psu* y *sid* se han relacionado con procesos de antiterminación de la transcripción, los cuales son importantes en la regulación de P4. El estudio de estas funciones se facilitó enormemente mediante el uso de fagos-plásmidos derivados que llevan los genes *psu* y *sid* (fragmento AD de *ÉcoRI*) ligado al gen kanamicina. Para probar la actividad antiterminadora de pP4, se usó un huésped en el cual se ha fusionado el operón del triptófano (dejando intacto el terminador) con el operón de la lactosa, del cual parte del promotor está ausente. El fenotipo de esta cepa es *lac*<sup>-</sup>, porque la transcripción termina en el terminador del triptófano y no puede ser reiniciada en el operón de la lactosa, aún cuando los genes estructurales de este operón están intactos. En presencia de pP4, no hay terminación de la transcripción en este terminador que es rho-dependiente, y la cepa bacteriana que lleva el plásmido es ahora *lac*<sup>+</sup>. Al utilizar plásmidos derivados con diversas mutantes de P4, se determinó que el gen responsable de esta actividad es *psu*. Para demostrar que sólo *psu* poseía esta actividad, se usó un derivado del plásmido pBR325 en el cual se ha clonado el gen *psu*, encontrándose una fuerte actividad antiterminadora en la cepa transformada con este plásmido. Se construyó además una cepa huésped represible para el operón del triptófano, y se comprobó que la expresión de  $\beta$ -galactosidasa es dependiente del operón del triptófano, lo cual implica la presencia de un solo mensajero comprendido desde el operón del triptófano hasta el operón de la lactosa.

En resumen, los resultados de esta tesis muestran que la propagación de pP4 está regulada por sus propios productos génicos. *Psu* es un

antiterminador de la transcripción que aparentemente interactúa con el factor rho;  $\alpha$  es necesario para la replicación de pP4, mientras que *int* le confiere la estabilidad. El control del número de copias por las condiciones de crecimiento del huésped está mediada por el circuito génico *psu- $\delta$ -sid* e *int*. Esta última propiedad, y la dualidad de P4 de propagarse como fago o plasmidio, proveen a este sistema con ventajas únicas en su uso como vector de clonamiento.



## ABSTRACT

Satellite phage P4 has been classified as a defective bacteriophage because it depends on a lysogenic or coinfecting helper such as coliphage P2 in order to undergo lytic development. P2 acts as a helper by providing the required gene products used by P4 for cellular lysis and for the assembly of its capsid and tail. Recently, it has been demonstrated that a single spontaneous mutation allows stable propagation of P4 as a plasmid. At the same time, there is a copy of P4 integrated into the host chromosome. Because P4 can replicate as a phage or as a plasmid, the study of this system is very attractive because of its potential use as a cloning vector. Furthermore, it allows the study of P4 in the absence of P2. The aim of this work is to examine the properties of P4 plasmid such as copy number, stability and replication, as well as the properties of the pP4 system, such as the expression of pP4 gene products and the P4 functions necessary for plasmid maintenance.

The pP4 copy number is found to depend on cellular growth conditions. Cells grown in LB (Luria Broth medium) with glucose at 30°C and aeration present a high copy number (30-40 per chromosomal equivalent). Lack of glucose, lack of aeration, and growth temperatures of 30°C diminish the copy number to 1-2. The effect of growth conditions upon copy number is demonstrated to be at the level of DNA replication. This is a genetic property of the P4 system, determined by the use of P4 $\delta$ inv9. This is a mutant constructed *in vitro*, which has lost the copy number dependency on growth conditions, and it is always found in the

high copy number state.

Two aspects of pP4 DNA replication are analyzed: the pP4 functions which are necessary for its replication, and the host functions necessary for the plasmid replication. On one hand, the gene product  $\alpha$ , which codifies for a putative primase is found to be necessary for pP4 replication. A temperature-sensitive mutant in  $\alpha$  is used, and when cells are grown under non-permissive conditions (42°C) no plasmid replication is observed. The copy integrated into the host chromosome is maintained in the non-permissive condition; the plasmid can then be reintroduced by shifting the cells to 37°C. On the other hand, by using *dna ts* mutants it is determined that the plasmid does not require the *dnaA*, *dnaB* and *dnaG* genes involved in DNA initiation, but requires the *dnaE* gene which codifies for a subunit of DNA polymerase III.

For pP4 stable maintenance the integration of a copy into the host chromosome is necessary. This is the first case wherein a mechanism involving a master copy for stable plasmid maintenance is described. A P4 derivative having the *EcoRI:AD* fragment ligated to a kanamycin gene was constructed. This plasmid contains all the necessary functions for P4 DNA replication and the *att* site in which recombination with the host chromosome is produced. However, this plasmid is defective in integration because the *int* gene is deleted, and can be maintained indefinitely as a high copy number plasmid only in the presence of kanamycin. When kanamycin is taken out of the culture, the plasmid segregates and the cells are cured of pP4. Complementation experiments show that when integration is forced, this plasmid is maintained stable

in the absence of kanamycin.

pP4 gene expression is studied in both the presence and the absence of P2. In the former case physiologic tests with pP4 strains superinfected with P2 and P2 mutants have been done. pP4 can suppress polarity (*psu* function), transactivate ( $\delta$  function) and direct small size capsid formation (*sid* function), but it is unable to interfere with P2 lytic growth (which is observed in the P4 phage). This suggests that the plasmid gene expression is different to the phage. The levels of pP4 gene products in the absence of P2 are examined. For this purpose the plasmid strain is constructed in a *uvrA* host. When these cells are irradiated with UV light, the host protein background diminishes and it is possible to detect the P4 gene products through electrophoresis of a [<sup>35</sup>S]-methionine labeled extract. In contrast with the phage, proteins  $\alpha$  (primase) and *psu* are not detected, and the *sid* protein is in small amounts. The non-essential protein 2 is present in an amount similar to that found in the phage state. The lack of the *psu* protein is consistent with a model in which this protein is a transcription antiterminator.

*Psu* and *sid* proteins have been related with transcription antitermination, a process which appears to be important in P4 regulation. The study of these functions is facilitated with the phage-plasmid derivatives carrying the *psu* and *sid* genes (*EcoRI*:AD fragment) ligated to a kanamycin gene. By using a host strain in which the tryptophan operon (with the terminator intact) is fused with the lactose operon with a partially deleted promoter, the pP4 antiterminator

activity is tested. The strain phenotype is  $lac^-$  because transcription ends in the tryptophan terminator and cannot be reinitiated in the  $lac$  operon although the structural genes for this operon are intact. There is no transcription termination in this rho-dependent terminator in the presence of pP4, and this strain is now  $lac^+$ . By utilizing plasmid derivatives with different mutations, it is determined that the gene responsible of this activity is *psu*. A strong antitermination activity is found when using the *psu* gene cloned in pBR325. A host-repressible for the tryptophan operon is constructed, and the expression of  $\beta$ -galactosidase activity is found to be dependent on the tryptophan operon, implying the presence of only one transcript from the tryptophan operon to the lactose operon.

To summarize, the results of this thesis demonstrate that pP4 propagation is regulated by its own gene products. *Psu* is a transcription antiterminator which apparently interacts with factor rho;  $\alpha$  is necessary for pP4 replication, while *int* function is related with pP4 stability. The copy number control by growth conditions is mediated by the gene circuitry *psu- $\delta$ -sid* and *int*. This property, and the capacity of P4 to propagate either as a phage or plasmid provide this system with unique advantages in its use as a cloning vector.

## INTRODUCCION

### *Caracterización inicial de P4*

P4 fue identificado originalmente como un virus satélite defectivo, ya que forma placas de lisis en *E. coli* solamente en presencia de P2 o fagos relacionados con P2. P4 es dependiente en su desarrollo lítico de las 18 funciones morfogenéticas y de lisis celular conocidas para P2 (Six y Klug, 1973; Six, 1975). P2 provee estas funciones ya sea en una coinfección con P4, o cuando P4 infecta una cepa lisogénica de P2. Debido a que P4 usa las proteínas estructurales provistas por P2, se espera que ambos sean similares morfológicamente. De hecho, las colas de ambos fagos son idénticas en tamaño, estructura y composición (Inman et al., 1971; Goldstein et al., 1974; Barrett et al., 1976). La cápside de P4 es sólo un tercio del tamaño de la de P2 (Inman et al., 1971; Shore et al., 1978), y al igual que este fago es de forma icosaédrica, pero sólo mide 455 Å de diámetro. Esta diferencia en tamaño de cápside, refleja la diferencia en el largo del DNA de estos dos fagos, ya que el DNA de P4 ( $7 \times 10^6$  daltons) es un tercio del tamaño del DNA de P2 (Inman et al., 1971; Goldstein et al., 1974). El DNA de P4, al igual que el de P2, es de doble hebra y no permutado, con extremos cohesivos de 19 pares de bases de DNA de hebra simple. Los extremos cohesivos de ambos fagos son idénticos, y a excepción de esto no existe homología entre ambos DNAs (Lindqvist, 1974), lo que indica que P4 no es una mera delección de P2.



### *Funciones genéticas codificadas por P4 y su relación con P2*

Hasta hace poco, el fago P4 se había estudiado en gran medida en el contexto de la infección lítica dependiente de P2. Este enfoque proporcionó bastante información en cuanto a las funciones fisiológicas, patrones de expresión, y tamaño de varios productos génicos codificados por P4, así como la localización de los genes correspondientes en el mapa genético de P4. Una excepción son los productos génicos  $\alpha$  y 2, los cuales aparentemente no tienen relación con P2. El gen  $\alpha$  codifica para una proteína de 88.000 daltons, requerida por P4 para la replicación de su DNA, a la que se le atribuye una actividad de DNA primasa (Barrett *et al.*, 1972; Gibbs *et al.*, 1973). El producto génico  $\alpha$  es expresado en niveles altos tanto en etapas tempranas como tardías en la infección viral. El producto génico 2 es una proteína de 45.000 daltons no esencial para el desarrollo lítico de P4, de función desconocida y que se expresa en niveles altos durante todo el transcurso de la infección viral (Barrett *et al.*, 1976; Kahn *et al.*, 1980).

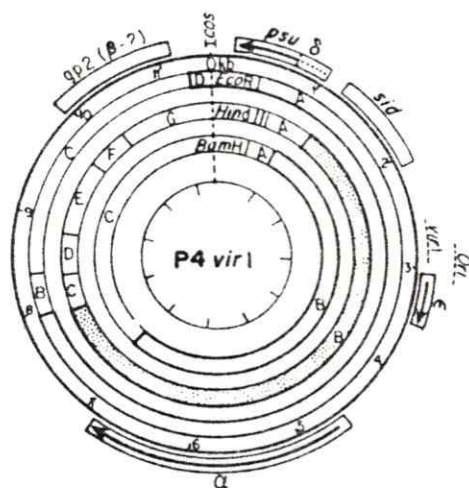
Como se dijo anteriormente, varios productos génicos de P4 se han estudiado en relación a su interacción con P2, pues P4 actúa como un elemento regulatorio *in trans* sobre P2, y altera la expresión de éste para favorecer el ciclo lítico de P4. Se pueden reconocer al menos cuatro funciones *trans* regulatorias que se describirán a continuación (ver propiedades y localización en el mapa genético en Tabla-Esquema 1).

El gen *sid* codifica para una proteína de 27.000 daltons, que es esencial para la determinación de cápsides pequeñas (Shore *et al.*, 1978; Geisselsoder *et al.*, 1982). Sid ejerce un control regulatorio sobre la

## Tabla-Esquema 1

## Propiedades relevantes de algunas funciones codificadas por P4

Funciones genéticas codificadas por P4	Actividad asociada a estas funciones
$\alpha$	Indispensable para la replicación del DNA de P4. Se cree es una DNA primasa.
$\delta$	Actúa en <i>trans</i> sobre el genoma de P2, activando los genes tardíos de éste, cuando el propio P2 es incapaz de hacerlo. Una mutante $\delta^-$ no produce la proteína <i>sid</i> en ausencia de P2.
$\epsilon$	Desreprime al profago de P2.
<i>psu</i>	Suprime polaridad transcripcional asociada a mutaciones ámbar en operones policistrónicos de P2. Actúa en <i>cis</i> sobre P4, modulando la expresión de $\alpha$ .
<i>sid</i>	Dirige la formación de cápsides pequeñas, que empaacan el genoma de P4. Tiene un efecto pleiotrópico sobre el gen $\delta$ , ya que una mutante <i>sid</i> es también $\delta^-$ .



Mapa genético de P4



expresión de las subunidades de la cápside de P2 a nivel transcripcional, presumiéndose que es un antiterminador que actúa sobre los operones morfogenéticos de P2 (Geisselsoder *et al.*, 1978). Se cree que por este efecto en la transcripción de P2, P4 interfiere con el ensamblaje de la cápside de P2, lo que resulta en una reducción del tamaño de explosión de éste, ya que el genoma grande de P2 no puede ser encapsidado completamente en las cápsides pequeñas de P4 (Diana *et al.*, 1978). La mutante ámbar P4*sid1* es incapaz de dirigir el ensamblaje de las cápsides pequeñas de P4 (Shore *et al.*, 1978), y no interfiere con el desarrollo lítico de P2. Esta mutante dirige el ensamblaje de cápsides del tamaño de P2, y el genoma de P4 es empacado en forma de dímero ó trímero. El efecto de la mutación *sid* es parcialmente revertido cuando P2 y P4*sid1* coinfectan un huésped defectivo en el factor rho. Cuando la terminación de la transcripción mediada por rho es defectiva, P2 produce un número significativo de cápsides pequeñas (Geisselsoder *et al.*, 1978). Esta mutación ejerce un efecto pleiotrópico sobre el gen  $\delta$ , ya que la mutante *sid* es además incapaz de *transactivar* al fago P2.

En una coinfección de P2:P4 en forma simultánea, los tamaños de explosión son similares, pero el tamaño de explosión de P2 está reducido en un sexto con respecto al que normalmente se encuentra en ausencia de P4. Cuando P4 preinfecta al huésped 10 minutos antes que P2, el tamaño de explosión de P4 es 300 veces mayor que el de P2, y el de P2 es 500 veces mas pequeño que el nivel normal. Cuando P4 preinfecta 20 minutos antes que P2, virtualmente no hay producción de P2 (Diana *et al.*, 1978). La mutante *sid* no interfiere con el desarrollo de P2, lo que sugiere que

el tiempo de expresión del producto *sid* es crítico en la interferencia del desarrollo lítico del fago P2.

Otra de las funciones regulatorias de P4 está codificada por el gen *psu*, de peso molecular 20.000, y cuya mutación causa una reducción de 3 a 6 veces del tamaño de explosión de P4 durante el desarrollo lítico dependiente de P2 (Sauer *et al.*, 1981). Al igual que *sid*, *psu* parece actuar a nivel de la terminación de la transcripción mediada por rho, *in trans* sobre el genoma de P2. *Psu* suprime polaridad transcripcional asociada a mutaciones ámbar en operones policistrónicos de P2, permitiendo que P2 sobrevenga estas mutaciones que de otra manera bloquearían la expresión de genes morfogenéticos o de lisis, que se encuentran distales a estas mutaciones (Sunshine *et al.*, 1976; Sauer *et al.*, 1981). La proteína *psu* tiene además un efecto regulatorio *in cis* sobre P4. Después de la infección viral, se produce la síntesis de la proteína  $\alpha$  durante los primeros 15 minutos la cual cesa abruptamente, para ser reiniciada después de los 60 minutos de la infección (Lee, 1981). La reiniciación de la síntesis de la proteína  $\alpha$  es dependiente del gen *psu*, ya que mutantes en este gen no la presentan (Lee y Goldstein, 1985). La reiniciación de la síntesis de la proteína  $\alpha$  se produce inmediatamente después de la aparición de la proteína *psu*. El efecto de la mutación *psu* sobre  $\alpha$  puede ser parcialmente revertido en un huésped rho defectivo. Lee y Goldstein (1985) proponen un modelo en el cual la acción antagónica de *psu* sobre el factor rho permitiría la reiniciación de la síntesis de  $\alpha$ .

El gen  $\epsilon$  está implicado en la desrepresión del profago de P2

(Geisselsoder *et al.*, 1981). A pesar de ser heteroinmune, P4 puede crecer en células lisogénicas para P2, desreprimiendo al profago (Six y Lindqvist, 1978) y permitiendo la expresión de los genes tempranos A y B de P2, los cuales a su vez permiten la replicación unidireccional *in situ* de P2 (Geisselsoder *et al.*, 1981), y la activación de los genes necesarios para el ensamblaje del fago. La mutante P4 $\epsilon$ 104 es incapaz de desreprimir a P2 en estado de profago (Geisselsoder *et al.*, 1981).

El gen  $\delta$  está envuelto en un fenómeno llamado *transactivación*. Normalmente, cuando P4 infecta un lisógeno de P2, el profago es desreprimido, y posteriormente P2 autoactiva sus propios genes tardíos. La activación de los genes tardíos depende que los genes A y B sean funcionales (Lindahl 1971; Lindqvist, 1971). Sin embargo, P4 puede crecer en un lisógeno de P2 aún cuando P2 sea defectivo en la replicación de su DNA, por lo tanto P4 tiene un modo de *transactivar* los genes tardíos de P2 requeridos para el desarrollo lítico (Lindqvist *et al.*, 1978). La mutante P4 $\delta$ 6 (Souza *et al.*, 1977) y P4 $\delta$ 35 (Kahn *et al.*, 1980) son incapaces de crecer en un lisógeno P2A<sup>-</sup> y por lo tanto son defectivos en *transactivación*. Este gen tiene un efecto pleiotrópico sobre la proteína *sid*, ya que ésta no se expresa en las mutantes  $\delta$  en ausencia del fago P2 (Lee, 1981). Las proteínas putativas codificadas por los genes  $\delta$  y  $\epsilon$  no han sido identificadas hasta el momento, por lo que su estudio se restringe a los análisis genéticos.

El estudio del desarrollo del fago P4 ha permitido identificar otros *loci* que no son responsables de interacciones con P2, pero que son necesarios para la mediación y establecimiento del estado lisogénico.

Este modo de propagación de P4 no requiere de los productos génicos de P2. El sitio *att* es requerido por P4 como el sitio específico de integración en el cromosoma bacteriano (Calendar et al., 1981). El gen *int* codificaría para una integrasa putativa esencial para la lisogenización (Calendar et al., 1981); en tanto que *CI* y *CI1* son represores putativos (Calendar et al., 1981).

#### *Replicación de P4 en ausencia de P2*

Hasta hace poco, prácticamente no se había prestado atención al estudio de P4 en ausencia de P2. Se sabía que P4 podía replicar su DNA en un huésped de *E. coli* en ausencia de P2 (Six y Lindqvist, 1971). Recientemente se descubrió que P4 podía propagarse como un plasmidio (pP4) en ausencia de P2 (Goldstein et al., 1982; Lagos y Goldstein 1984; Deho et al., 1984). Una mutación espontánea, *vir1*, en una base, del tipo promotor-up (Lin y Six, comunicación personal), permite que P4 funcione como un plasmidio. Una infección con P4<sub>vir1</sub>, en ausencia de P2, no produce progenie porque P4 es incapaz de sintetizar las proteínas del virión, pero este fago es capaz de ser mantenido estable como un plasmidio, en número alto de copias (Lagos y Goldstein, 1984).

#### *Exposición del problema*

Las propiedades de P4 como fago y plasmidio hacen muy atractivo el uso de este sistema como vector de clonamiento, y por otra parte, la mantención del plasmidio en ausencia de P2 provee un sistema más simple para el estudio de las funciones regulatorias de P4. Con este doble objetivo, se abordó la caracterización del estado de plasmidio en cuanto

a sus propiedades básicas, y haciendo uso de este estado, se estudiaron algunas de las funciones regulatorias de P4. Para este estudio se usó la mutante *vir1* de P4, pero para simplificar el texto, cada referencia a pP4*vir1* se hará como pP4.

La caracterización de las propiedades básicas de pP4 se hizo en la forma tradicional: número de copias, estabilidad, y funciones de P4 y del huésped necesarias para la propagación del plasmidio. Se encontró que pP4 podía propagarse en número alto y bajo de copias dependiendo de las condiciones de crecimiento del huésped (Lagos y Goldstein 1984). Esta parece ser una propiedad genética de P4, ya que una mutante construida *in vitro* ha perdido esta capacidad. El mecanismo por el cual pP4 es mantenido en forma estable es mediante una "copia maestra" en el cromosoma bacteriano (Kim, Lagos y Goldstein, en preparación), siendo éste un mecanismo que no ha sido previamente descrito. Al mismo tiempo que P4 se propaga como plasmidio, existe una copia integrada en el cromosoma bacteriano, la cual asegura que las células hijas portarán P4. P4 es capaz de "saltar" al citoplasma celular, probablemente a través de la replicación *in situ* del profago. La potencialidad de P4 de propagarse ya sea, en número alto de copias, o integrado en el cromosoma bacteriano, o como un fago lítico, será de gran utilidad en el clonamiento de insertos de DNA cuya sobreexpresión en *E. coli* sea letal para las células.

Se determinó que la replicación del DNA de pP4, al igual que el fago, requiere de la proteína  $\alpha$ . Por otra parte, se estudiaron las funciones celulares que son necesarias para la replicación del

plasmidio. Esta información es muy útil en estudios de expresión genética de plasmidios híbridos, ya que usando diferentes mutantes de funciones celulares necesarias para la replicación del DNA, se puede lograr que la replicación sea dirigida por uno u otro tipo de plasmidio. Al igual que para el fago P4, se encontró que de las funciones celulares analizadas, pP4 sólo requería la DNA polimerasa III para su propagación.

Paralelamente, se empezó a definir el estado de plasmidio de P4 en términos de la expresión de sus productos génicos y de su regulación. Anteriormente, se había hecho un análisis cinético de la expresión de los productos génicos de P4 en ausencia de P2, después de la infección viral (Lee S., 1981). Se sugirió entonces, que los niveles de expresión podrían ser los que se encontrarían en el estado de plasmidio estable, es decir, niveles de expresión alto de los productos génicos de P4. Sin embargo, durante la fase inicial de infección analizada (hasta 10 horas), P4 aún no es mantenido en forma estable como plasmidio, y las células presentan un efecto negativo severo después de la infección. Esto se traduce en un aumento en el tiempo de duplicación y filamentación. Posteriormente, cuando se aíslan clones que llevan pP4 estable, la filamentación desaparece y el tiempo de duplicación celular es el mismo que el de la cepa parental. Estos resultados sugieren que en contraste con lo observado en el estado inicial de infección (Lee y Goldstein, 1985), los niveles de expresión génica entre este estado y el de plasmidio serían sustancialmente diferentes. Apoyo para esta hipótesis sería la existencia de niveles altos de los antiterminadores



putativos *sid* y *psu* después de la infección. Estos serían responsables de la filamentación y del aumento en el tiempo de duplicación, al antagonizar con el factor terminador de la transcripción *rho* del huésped, ya que células con un alelo *rho* defectivo exhiben este fenotipo (Das et al., 1976; Inoko et al., 1977). Se esperaría entonces, que la expresión de *sid* y *psu* debería llegar a niveles bajos o nulos, permitiendo la propagación de P4 como un plasmidio estable. Se probó esta hipótesis usando un sistema similar al descrito para el análisis de los productos génicos de P4 después de la infección viral, es decir, usando un huésped defectivo en la reparación del DNA dañado con luz ultravioleta, lo cual reduce considerablemente la síntesis de proteínas del huésped. Esto permite visualizar las proteínas codificadas por el plasmidio, el cual es menos afectado por la acción de la luz ultravioleta.

Finalmente, el o los antiterminadores de la transcripción codificados por P4, parecen ser claves en la regulación de la expresión de P4 ya sea como fago o plasmidio. El ejemplo de antiterminador de la transcripción mejor entendido lo provee el fago lambda. Existen varios terminadores de la transcripción dentro de los operones tempranos de lambda. La proteína N impide la terminación de la transcripción en cada uno de estos sitios. La antiterminación mediada por N permite que la RNA polimerasa transcriba los genes distales a estos terminadores, siendo esta acción esencial para el desarrollo lítico del fago (Roberts, 1969). En contraste con lambda, la antiterminación en P4 no ha sido estudiada en profundidad, y la evidencia presentada hasta el momento le asignaba un



rol de antiterminador de la transcripción a la proteína *psu* en operones del fago P2. El sistema de plasmidio de P4 permitió realizar un estudio más acabado acerca de este antiterminador, comprobándose su acción sobre un terminador rho-dependiente de un operón bacteriano (Lagos *et al.*, 1985). Esta aproximación al estudio de la terminación de la transcripción en P4 es pieza fundamental para el entendimiento de la complicada regulación en *cis* de P4 por sus propios productos génicos, y desde un punto de vista más general, puede ser de importancia (como lo ha sido N de lambda) en el descubrimiento o caracterización de proteínas del huésped implicadas en la terminación de la transcripción como son rho, nus y las proteínas ribosomales S10 y L11 (Ward y Gottesman, 1982; Greenblatt, 1981).

## MATERIALES Y METODOS

### REACTIVOS

Bromuro de etidio, yoduro de propidio, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosido, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosido, lisozima, BSA, timina, glicina, dodecil sulfato de sodio, antibióticos, DTT, ATP, EDTA, AMP, cAMP, Tris, DNA de espermios de salmón, ficol, polivinil pirrolidona, proteinasa K, azida de sodio y sarcocine fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Glucosa, polietilenglicol, glicerol, ácidos, solventes orgánicos y sales inorgánicas fueron obtenidas de Fisher. Las enzimas de restricción fueron obtenidas de Biolab. Los reactivos para la reacción de reparación inducida por un corte en el DNA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, DNA polimerasa, DNasa I, fueron obtenidos de Bethesda Research Laboratories (BRL). Acrilamida, bis acrilamida y agarosa de BioRad. Sephadex G-50 de Pharmacia. Triptona, extracto de levadura, agar, agar Mac Conckey fueron obtenidos de Difco. Cloruro de Cesio fue obtenido de Metallgesellschaft. Papel filtro 3 MM y filtros de microfibras de vidrio GF/C fueron obtenidos de Whatman. Filtros de nitrocelulosa GMBH de Schleicher and Schuell. Líquido de centelleo Biofluor de New England Nuclear. [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP 410 Ci/mmol, [ $6$ - $^3$ H]-timidina 16,2 Ci/mmol, [ $^{35}$ S]-metionina 400 Ci/mmol fueron obtenidos de Amersham.

### CEPAS DE FAGOS Y BACTERIAS

Todas las cepas bacterianas usadas en este trabajo para crecer los fagos P2 y P4 son derivadas de *Escherichia coli* C (Bertani y Weigle,

1953), así como la gran parte de las cepas usadas para la construcción de los plasmidios de P4. Adicionalmente, se usaron cepas derivadas de *Escherichia coli* K12 para algunos experimentos de transformación bacteriana y para los estudios de antiterminación de la transcripción por P4. En la Tabla A se presenta una lista de estas cepas.

C1a y C1757 fueron usadas para el crecimiento en líquido de P2<sub>vir1</sub> y mutantes ámbar de P2 respectivamente. C1055 y C1757 fueron usadas como cepas indicadoras de P2. C1895 y C1792(P2/g cc) fueron usadas para el crecimiento de todas las cepas de P4. C1792(P2/g cc) fue usada como cepa indicadora de P4. C345, C1759, y C5112 fueron utilizadas como cepas indicadoras para probar los fenotipos de las cepas mutantes de P4  $\delta$ ,  $\alpha$  o  $\epsilon$ , y *psu* respectivamente. Todas las cepas indicadoras son de crecimiento lento y poliauxotróficas, lo cual permite obtener placas de lisis más grandes sobre el césped bacteriano. El uso de las otras cepas está descrito en el texto.

P2 y mutantes de P2 fueron usados como fagos coadyutores de P4. P2/g cc (Bertani et al., 1978) presenta un tamaño de explosión mayor al ensamblarse más eficientemente. La mutación /g de P2/g cc corrige un defecto en el proceso de conexión cápside-cola que ocurre en el ensamblaje de P2<sub>wt</sub>. Las otras mutantes de P2 están descritas en la Tabla B.

Todas las mutantes de P4 usadas están descritas en la Tabla B y en el texto.

#### MEDIOS DE CULTIVO

Medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,55%)

TABLA A

*Cepas Bacterianas*

Cepa	Genotipo relevante	Referencia/Origen
C1a	F <sup>-</sup> , prototrófica	Sazaki y Bertani, 1965
C1a(P4wt)	Lisógeno de P4	Este trabajo
C1a(pP4 <i>vir1</i> ) y mutantes de- rivadas	Se construyeron 4 derivados <i>vir1</i> independientemente, y los siguientes mutantes: <i>psu1</i> , <i>psu2</i> , $\delta 35$ , <i>sinv9</i> , <i>sinv11</i> , <i>sid1</i> , $\Delta 10$ , <i>ats61</i> , <i>EcoRI:AD-Km(1)</i> , <i>EcoRI:AD-Km(2)</i> <i>EcoRI:ADC-Km</i> , <i>EcoRI:ADBC-Km</i> , <i>sid::Tn5</i> .	Este trabajo
C1apBR325	Por transformación	Este trabajo
C1apUC4K	Por transformación	Este trabajo
C1055	F <sup>+</sup> , poliauxotrófica, cepa indicadora de P2	Sironi, 1969
C1792	F <sup>-</sup> , poliauxotrófica, <i>supF</i>	Sunshine et al., 1971
C179X	C1792(P2/g cc), cepa indicadora de P4	Sunshine et al., 1971
C1757	F <sup>-</sup> , poliauxotrófica, <i>supD</i>	Sunshine et al., 1971
C1895	F <sup>-</sup> , poliauxotrófica, <i>supD</i> , (P2/g cc)	Barrett et al., 1976
C345	F <sup>+</sup> , poliauxotrófica, (P2A $\alpha$ 127)	Souza et al., 1977
C339	F <sup>-</sup> , (P2/g cc)	E. Six
C5112	F <sup>+</sup> , poliauxotrófica, (P20 $\alpha$ 71) (P2L $\alpha$ 9)	Kahn et al., 1980
C1843	F <sup>-</sup> , poliauxotrófica	Sunshine et al., 1971

C1843(pP4 <i>vir1</i> ) y mutantes de- rivadas	Se construyeron las si- guientes mutantes: <i>psu1</i> $\delta 35$ , <i>sid1</i> , $\delta inv9$ , $\delta inv11$ .	Este trabajo
C1844	C1843, <i>suA</i>	Sunshine et al., 1971
C1844(pP4 <i>vir1</i> ) y mutantes de- rivadas	Se construyeron las si- guientes mutantes: <i>psu1</i> , $\delta 35$ , <i>sid1</i> , $\delta inv9$ , $\delta inv11$ , $\epsilon_{\Delta 104}$ .	Este trabajo
C3103	F <sup>-</sup> , <i>uvrA</i> , <i>thyA</i> , <i>hgl</i> <sup>+</sup>	Geisselsoder et al., 1981
C3103(pP4 <i>vir1</i> ) y mutantes de- rivadas	Se construyeron las si- guientes mutantes: <i>psu1</i> , <i>psu2</i> , $\delta 35$ , $\delta inv9$ , $\delta inv11$ , <i>sid1</i> , $\Delta 10$ .	Este trabajo
C3104	C3103 <i>rho102</i>	Deho, Tinelli y Goldstein
C3104(pP4 mu- tantes)	Se construyeron las si- guientes mutantes: $\delta inv9$ $\delta inv11$ , $\epsilon_{\Delta 104}$ .	Este trabajo
C2307	F <sup>-</sup> , <i>uvrA</i> , <i>thy</i> , <i>dnaA46</i>	Bowden et al., 1975
C2307(pP4 <i>vir1</i> )		Este trabajo
C2309	F <sup>-</sup> , <i>uvrA</i> , <i>thy</i> , <i>dnaG3</i>	Bowden et al., 1975
C2309(pP4 <i>vir1</i> )		Este trabajo
LD301	F <sup>-</sup> , <i>uvrA</i> , <i>thyA</i> , <i>EndoI</i> , <i>dnaE</i>	Dumas y Miller, 1973
LD301(pP4 <i>vir1</i> )		Este trabajo
LD312	F <sup>-</sup> , <i>uvrA</i> , <i>thyA</i> , <i>EndoI</i> , <i>dnaB</i>	Dumas y Miller, 1973
LD312(pP4 <i>vir1</i> )		Este trabajo
LD331	F <sup>-</sup> , <i>uvrA</i> , <i>thyA</i> , <i>EndoI</i> , <i>dnaC</i>	Dumas y Miller, 1973
MC1061	F <sup>-</sup> , poliauxotrófica	Berman et al., 1982



MC1061(pP4 mu- tantes)	Se construyeron las si- guientes mutantes: <i>EcoRI</i> :AD-Km(1), <i>EcoRI</i> :AD- Km(2), <i>EcoRI</i> :ADC-Km, <i>EcoRI</i> :ADBC-Km.	Este trabajo
MC1061pBR325	Por transformación	Este trabajo
MC1061pUC4K	Por transformación	Este trabajo
XB605	F <sup>-</sup> , <i>trpR</i> , $\Delta(lac)U169$ , <i>strpA</i> $\Delta(tonB-lacP)$	Guarente y Beckwith, 1978.
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> (pP4 mutantes)	Se construyeron las si- guientes mutantes: <i>EcoRI</i> : AD-Km, <i>EcoRI</i> :AD-Km <i>psu1</i> , <i>EcoRI</i> :AD-Km $\delta 35$ , <i>EcoRI</i> :AD- Km $\delta inv9$ , <i>EcoRI</i> :AD-Km $\delta inv11$ , <i>EcoRI</i> :AD-Km <i>sid1</i> .	Este trabajo
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pJG76	Por transformación	Este trabajo
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> <i>trpR</i> <sup>+</sup> pJG76	Por transducción con P1	Este trabajo
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pPBR325		Este trabajo
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pUC4K		Este trabajo
X10008	XB605 <i>rho201</i>	Guarente y Beckwith, 1978
X10014	XB605 <i>rpo203</i>	Guarente y Beckwith, 1978
X10015	XB605 <i>rho201</i> , <i>rpo203</i>	Guarente y Beckwith, 1978

---

TABLA B

*Cepas de fagos*

Cepas	Genotipo relevante	Referencia/origen
P4wt	Sensible a inmunidad de P4	Six y Klug, 1973
P4vir1	Parcialmente insensible a la inmunidad de P4; capaz de replicarse como plasmidio en ausencia de P2	Lindqvist y Six, 1971
P4 $\alpha$ ts61vir1	Incapaz de replicar su DNA a la temperatura permisiva (42°C).	Barrett et al., 1983
P4 $\delta$ 35vir1	Incapaz de transactivar los operones tardíos de P2	Kahn et al., 1980
P4 $\psi$ sulvir1	Incapaz de suprimir polaridad asociada a mutaciones ámbar en genes policistrónicos de P2	Sauer et al., 1981
P4 $\psi$ su2vir1	Igual fenotipo que $\psi$ sul	Sauer et al., 1981
P4sid1vir1	Incapaz de dirigir la síntesis de cabezas pequeñas	Shore et al., 1978
P4 $\epsilon$ a $\pi$ 104vir1	Incapaz de desreprimir un profago de P2	Geisselsoder et al., 1981
P4 $\Delta$ 2vir1	Delección en región <i>int-att</i>	Souza et al., 1978
P4 $\Delta$ 10vir1	Delección en región no esencial	Kahn et al., 1980
P4CI	Mutación en el represor, incapaz de lisogenizar	Calendar et al., 1981
P4CII	Mutación en el represor, incapaz de lisogenizar	Calendar et al., 1981

P48inv9vir1	Incapaz de <i>transactivar</i> y suprimir polaridad en P2. Construida por inversión del fragmento <i>HindIII</i> :B	Jiang y Goldstein
P48inv11vir1	Incapaz de <i>transactivar</i> y suprimir polaridad en P2. Construida por inversión del fragmento <i>BamHI</i> :B	Jiang y Goldstein
P4vir1EcoRI:AD-Km	Delección de los fragmentos B y C de <i>EcoRI</i> , e inserción del fragmento kanamicina de pUC4K	Este trabajo
P4vir1EcoRI:ADC-Km	Como arriba, pero sólo con delección del fragmento B	Este trabajo
P4vir1EcoRI:ADBC-Km	Inserción del fragmento kanamicina de pUC4K	Este trabajo
P2vir1	Placas claras, sensible a la inmunidad de P2	Bertani, 1957
P20a#71	Incapaz de romper la proteína mas grande de la cápside	Lengyel et al., 1973; 1974
P2La#7	Defectivo en proteína de la cápside	Lindhal, 1971
P2Ra#129	Incapaz de replicar su DNA y activar sus genes tardíos	Lindhal, 1970

---

suplementado con NaCl 0,45%, glucosa 0,4%, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1,6 mM (Barrett et al., 1976) denominado MLBG, se usó para crecer las cepas indicadoras y para el crecimiento en líquido de P2 y P4. El medio LBG es medio LB suplementado con glucosa 0,4%. El medio LX es medio mínimo TPG (KCl 0,8%, NaCl 0,05%, NH<sub>4</sub>Cl 1,1%, piruvato de sodio 0,08%, MgCl<sub>2</sub> hexahidratado 0,02%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,4 mM, Tris 100 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro 0,16 mM, a pH 7,5) suplementado con glicerol 0,2%, maltosa 0,4%, CaCl<sub>2</sub> 1mM y timidina 0,05 mM (Geisselsoder et al., 1981), y se usó en los experimentos de marcación con radiactividad de las proteínas de P4. El medio mínimo M63 contenía, por litro, 13,6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5mg de FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O ajustado a pH 7,0 con KOH. El medio mínimo M9 contenía, por litro, 6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de NaCl, 1 g de NH<sub>4</sub>Cl, añadiéndose 10 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 10 mM después de esterilizar por autoclave. Los medios mínimos M63 y M9 fueron suplementados después de ser esterilizados por autoclave (1 litro de volumen), con 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 1M, 10 ml de una solución al 20% de glucosa o glicerol, vitamina B1 a una concentración final de 1 µg/ml y aminoácidos (cuando eran requeridos) a una concentración final de 80 µg/ml de la forma D,L ó 40 µg/ml de la forma L. El medio mínimo PB (Reznikoff et al., 1969) contenía, por litro, 11,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 g de MgSO<sub>4</sub>, 1 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,5 g de citrato de sodio. Este medio era suplementado como se indicará en el texto. El medio sólido completo usado normalmente en placas contenía, por litro, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar. Después de ser esterilizado por autoclave, este medio era suplementado

con 4 ml de timidina 0,25%, 10 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M y 2,5 ml de glucosa 40%. El agar blando usado en la titulación de fagos fue básicamente el mismo medio descrito anteriormente, a excepción que la concentración final de agar fue de 0,75%. El medio sólido usado para placas suplementadas con antibióticos (a concentraciones que se indicarán en el texto) contenía, por litro, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 2,5 ml de glucosa 40% y 15 g de agar. El antibiótico era agregado después de esterilizar por autoclave y cuando la temperatura del medio no era superior a 50°C. El medio mínimo sólido usado contenía por litro, 15 g de agar, 10,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 4,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 0,5 g citrato de sodio  $2 \text{H}_2\text{O}$ . Después de ser esterilizado por autoclave este medio era suplementado con 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  20%, 0,5 ml de tiamina 1%, 10 ml de una solución al 10% del azúcar requerido, y 10 ml de una solución de 4 mg/ml del aminoácido requerido. Suplementaciones adicionales a este medio serán descritas en el texto.

#### *PURIFICACION Y CRECIMIENTO DE FAGOS*

Se prepararon soluciones de fagos de bajo título crecidos en placas de acuerdo a Walker y Anderson (1970). Se colectaban 1.000 a 10.000 placas de lisis de P2 ó 10.000 a 100.000 placas de lisis de P4 por placa Petri. El agar de una placa Petri se cubría con 4 ml de amortiguador P ( $\text{MgCl}_2$  0,01 M, Tris 0,01 M, acetato de amonio 0,14 M, pH 7,3), se raspaba el agar blando, se agitaba vigorosamente y se sacaban los restos celulares y agar por centrifugación durante 20 minutos a 10.000 g a 4°C.

Soluciones de fagos de alto título se prepararon de acuerdo a Shore



et al. (1978). 20 ml de un cultivo crecido durante la noche eran inoculados en 400 ml de MLBG y crecidos en un baño a 37°C con agitación hasta una densidad óptica de 0,1 a 600 nm. El cultivo se infectaba con una placa de lisis de P2 ó P4 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 a 0,1. El crecimiento celular se seguía en un Spectronic 20, y cuando éste cesaba de ser logarítmico, el cultivo se suplementaba con EDTA a una concentración final de 2 mM. Después de completada la lisis, los restos celulares se decantaban por centrifugación a 8.000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante era llevado a una concentración final de NaCl de 3%, polietilenglicol de 5% y de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M (este último estabiliza a P4, Lindqvist y Six, 1971), y centrifugado a 13.200 g durante 50 min a 4°C. Los fagos así precipitados eran resuspendidos en 4 ml de amortiguador P. Esta suspensión era tratada con cloroformo de modo de extraer las proteínas celulares, agitada usando un Vortex y centrifugada en una centrifuga clínica a la velocidad máxima durante 15 min. El sobrenadante era dializado extensivamente contra amortiguador P, de modo de extraer el cloroformo remanente.

#### *CONSTRUCCION DE CEPAS QUE LLEVAN EL PLASMIDIO DE P4*

Cultivos de células crecidas durante la noche en MLBG a 37°C eran diluidos 100 veces en el mismo medio. Las células eran crecidas con aireación a 37°C hasta una concentración aproximada de  $2 \times 10^8$  cél/ml, siendo infectadas con la cepa de P4 deseada a una multiplicidad de infección de 5. Esta mezcla era incubada por 10 min a temperatura ambiente y plaqueada de modo de obtener colonias únicas. Las colonias

que contenían pP4 eran identificadas mediante el "patch test". Las colonias positivas eran crecidas nuevamente. Se realizaban tres ciclos de crecimiento y "patch test", de modo de asegurarse que las cepas aisladas contenían pP4 en forma estable. Todas las cepas de P4 y mutantes derivadas que se mantenían en forma estable llevaban la mutación *vir1*.

#### SELECCION DE CLONES PUTATIVOS QUE PORTAN pP4 EN FORMA ESTABLE

Las colonias que se deseaban probar eran enterradas en placas que se preparaban de la siguiente manera: 0,3 ml de un cultivo exponencial de C1792(P2/g cc) crecido en MLBG era mezclado con agar blando, y esta mezcla era vertida en placas que contenían medio sólido completo. Después que el agar blando se solidificaba, se esparcía sobre él 0,1 ml de una solución que contenía  $10^7$  partículas de P2*vir1*. Cada una de estas colonias enterradas crecía, y era infectada en su perímetro externo en la capa superior de agar por P2*vir1*. Esta infección inducía al ciclo lítico a las células que llevaban pP4, con la consiguiente liberación de partículas de P4. A su vez, estas partículas de P4 infectaban las células de la cepa indicadora de P4 incluidas en el agar blando, lo que originaba lisis celular visible en torno a la colonia probada. La presencia de este halo era indicación que la colonia probada contenía P4. Esta prueba fue denominada "patch-test". La lisis no podía ser debida a la infección con P2*vir1*, porque este fago es sensible a la inmunidad de la cepa indicadora de P4.

#### DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS DEL PLASMIDIO

Las determinaciones del número de copias de la forma covalentemente cerrada y superenrollada de los plasmidios, se realizaron de la siguiente manera: cultivos crecidos durante la noche a una temperatura dada (30, 33, 37 ó 42°C) en medio LB (+glucosa 0,4%, +NaCl 0,45%, toxigenación) se diluyeron 100 veces en el medio respectivo, y crecidos en un baño con agitación a la temperatura deseada, hasta alcanzar una concentración de  $2 \times 10^8$  células/ml (densidad óptica de 0,35 a 600nm). Tres ml de estos cultivos eran marcados con [6-<sup>3</sup>H]-timidina (a una concentración final de 30 µCi/ml) durante 60 minutos. Cada uno de estos cultivos era enfriado en hielo y lavado dos veces en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) que contenía azida de sodio 20 mM y suspendido en 2 ml de amortiguador TE. Estas suspensiones eran lisadas agregando 0,1 ml de lisozima (5 mg/ml) y 0,1 ml de Sarcocine (5% p/v), manteniéndolas a 0°C hasta que se observaba lisis celular. Cada lisado era pasado 5 veces a través de una aguja 21-6 y se ajustaba a un volumen final de 8 ml. Luego se agregaban 8 g de CsCl y 1,5 ml de yoduro de propidio (2 mg/ml) por lisado, y se centrifugaba al equilibrio a 17°C durante 42 horas a 40.000 rpm en un rotor Beckman-Spinco 50 Ti (Ely y Staudenbauer, 1981). El fraccionamiento de los gradientes y la determinación del número de copias era realizado como está descrito en los estudios de Timmis *et al.* (1975). Alícuotas de cada fracción (0,1-0,15 ml) se precipitaban en filtros de fibra de vidrio GF/C con 10% TCA, 10 mM pirofosfato de sodio durante 15 min, y luego se lavaban 2 veces (15 min cada vez) en una solución de 5% TCA, para ser finalmente

tratados con acetona fría durante 15 min y contados en un contador de centelleo. El cálculo de número de copias se hacía estimando el peso del cromosoma en  $2,5 \times 10^7$  daltons y el peso de pP4 en  $7,4 \times 10^6$  daltons. Es importante destacar que este procedimiento indica el número de copias por cromosoma equivalente, por lo que en realidad el número de copias por célula es probablemente mayor por un factor de 2-3, ya que las mediciones eran realizadas en un cultivo en crecimiento exponencial, en donde el número de cromosomas por célula en *E. coli* es de 2 a 3.

#### DETERMINACION DE SINTESIS TOTAL DE DNA

La síntesis total de DNA se determinó en las cepas *dna ts* en las condiciones de temperatura permisiva (30°C), y no permisiva (42°C). Un cultivo en fase exponencial de crecimiento a 30°C ( $2 \times 10^8$  cél/ml) era diluido 5 veces en el mismo medio (LBG suplementado con 2,5 µg/ml de timidina). En ese momento las células eran marcadas con 12 µCi/ml de [6-<sup>3</sup>H]-timidina, dividiéndose en porciones que eran incubadas a 30 y 42°C. El momento del cambio de temperatura y marcación con radiactividad representa el tiempo 0. A diferentes intervalos, alícuotas de 0,05 ml eran depositadas en filtros de vidrio GF/C previamente humedecidos con NaOH 0,1 N, SDS 0,2%. Los filtros eran tratados con TCA del mismo modo que en la determinación del número de copias de plasmidio, y contados en un contador de centelleo.

#### ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Estas se llevaron a cabo en una configuración horizontal, usando amortiguador Tris-acetato (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA

2 mM, pH 8,1, (Davis *et al.*, 1980). La concentración de agarosa usada variaba entre 0,7 y 1% (según se indique). Los volúmenes de muestra usados por carril fluctuaban entre 15 y 25  $\mu$ l, de acuerdo a la peineta usada. El colorante usado para poner la muestra contenía glicerol 20% y azul de bromofenol 0,25%. El volumen del gel era de 150 ml (30 x 20 x 0,25 cm), la cámara de electroforesis era llenada con 1,8 l de amortiguador, y el gel quedaba cubierto con 2 a 3 mm de líquido. Las electroforesis se corrían durante la noche a una intensidad de 70 mA y a una corriente de 40 V. Posteriormente, el gel era teñido con una solución de 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio durante 60 min. El DNA se visualizaba con luz ultravioleta, y el gel se fotografiaba con una máquina Polaroid cargada con película rápida.

#### *AISLAMIENTO DE DNA DE PLASMIDIO*

Para el aislamiento rápido de plasmidios se usó básicamente el método de extracción alcalina descrito por Berman *et al.* (1982). Cuatro ml de células crecidas durante la noche eran centrifugados a 7.000 g durante 5 min. Cada precipitado era resuspendido en 0,1 ml de una solución de glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, que contenía lisozima 2 mg/ml (agregada sólo antes de usar), y se dejaba en hielo durante 30 min. Luego se agregaban 0,2 ml de una solución de NaOH 0,2 N, SDS 1%, se agitaba suavemente, y se dejaba en hielo por 5 min. Se añadían 0,15 ml de acetato de sodio 3 M, pH 4,8, se agitaba suavemente y se dejaba por 60 min en hielo. Se centrifugaba a 20.000 g durante 20 min y se colectaba el sobrenadante. A 0,4 ml de este sobrenadante se agregaba 1 ml de etanol, y se dejaba a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 60 min. Se centrifugaba a



20.000 g durante 5 min y el sobrenadante se descartaba. El precipitado se resuspendía en 0,36 ml de agua destilada, y se agregaban 0,04 ml de acetato de sodio 3 M pH 4,8, y el DNA se reprecipitaba añadiendo 1 ml de etanol. Se enfriaba a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaba a 20.000 g durante 5 min. El sobrenadante se descartaba y el precipitado se secaba, para luego resuspenderlo en 0,1 ml de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). El DNA de plasmidio así obtenido quedaba en condiciones de ser tratado con enzimas de restricción. Si se deseaba un DNA de plasmidio de mayor pureza, se seguía el mismo tratamiento, amplificando los volúmenes 100 veces hasta la etapa de precipitación del DNA cromosomal con acetato de sodio 3 M, y 8 ml del sobrenadante obtenido eran mezclados con 8 g de CsCl y 1 ml de bromuro de etidio 5 mg/ml. Se centrifugaba al equilibrio en un rotor 50 Ti Beckman-Spinco a 40.000 rpm por 42 horas. La banda de DNA de alta densidad correspondía a la de la forma superenrollada del plasmidio y era colectada punzando el tubo con una aguja de 20 ó 21-G. El colorante se extraía con isopropanol saturado con una solución acuosa de NaCl 5 mM en TE pH 8,5 (Davis et al., 1980).

#### PREPARACION DE DNA TOTAL

Se utilizó el método descrito por Berman et al., (1982). Se crecían 10 ml de células durante la noche, y se centrifugaban a 7.000 g durante 5 min. El precipitado se resuspendía en 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 50 mM, lisozima 1 mg/ml y se incubaba por 30 min en hielo. Se agregaba 0,1 ml de solución STEP (SDS 0,5%, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA

0,4 M, proteinasa K 1 mg/ml) y se calentaba a 50°C durante 15 min. Se añadía 0,6 ml de fenol saturado con amortiguador Tris, se mezclaba durante 5 min para emulsionar, y se centrifugaba para separar las fases (el DNA está en la fase superior). El sobrenadante se transfería a un nuevo tubo y se agregaban 0,06 ml de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol, invirtiendo el tubo para mezclar. Con una varilla de vidrio se enrollaba el DNA, y sacando el máximo de alcohol se transfería a un tubo que contenía 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM y RNAsa 50 µg/ml. El DNA se disolvía suavemente y luego se incubaba a 37°C por 30 min. Se añadía 0,5 ml de cloroformo y se agitaba para emulsionar. Se centrifugaba para separar las fases y se transfería la fase superior a otro tubo. Se añadían dos volúmenes de etanol y se invertía el tubo para mezclar. El DNA precipitado se enrollaba con una varilla de vidrio, resuspendiéndolo en 0,2 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM. El DNA así preparado podía ser tratado con enzimas de restricción.

#### *DIGESTION DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN*

En la mayoría de los casos la enzima de restricción usada fue *EcoRI*. Las condiciones para digerir DNA con esta u otras enzimas fueron tomadas del catálogo de BRL. Para el caso de la enzima *EcoRI* se usaban las siguientes condiciones: Tris-HCl 100 mM pH 7,2, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, NaCl 50 mM, 1 unidad de *EcoRI*, 0,2-1 µg de DNA en un volumen que fluctuaba entre 15-30 µl. Esta mezcla se incubaba durante 60 min a 37°C. La reacción se detenía agregando la mezcla que contenía

el colorante y glicerol, descrita en la preparación de geles de agarosa.

*TRANSFERENCIA DE DNA DESDE GELES DE AGAROSA A FILTROS DE NITROCELULOSA, E HIBRIDACION CON DNA DE P4*

El método usado para la transferencia de DNA es esencialmente el descrito por Southern (1975). Después de la electroforesis en geles de agarosa, el gel se teñía con bromuro de etidio y se cortaban las porciones no usadas del gel. El DNA se hidrolizaba parcialmente remojando el gel en 0,25 M de HCl durante 15 min (dos veces). Luego, el DNA se desnaturaba remojando el gel en NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M durante 15 min (2 veces). El gel se lavaba brevemente y se neutralizaba con Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, NaCl 1,5 M durante 30 min (2 veces). Con papel Whatman 3MM se envolvía una placa de vidrio la cual se ponía atravesada en una fuente, de modo que el papel formaba un puente con el líquido que estaba en la fuente, y la placa de vidrio actuaba como soporte de este papel. La fuente se llenaba con 10 x SSC (87,65 g de NaCl y 44,1 g de citrato de sodio ajustado a pH 7,0 en un litro de agua) y se sacaban las burbujas que podía tener el papel. Se ponía el gel sobre este papel mojado, y se cubría con un filtro de nitrocelulosa (previamente humedecido con 2 x SSC) del mismo tamaño del gel, cuidando de no dejar burbujas entre el gel y el filtro. Sobre el filtro se ponían dos capas de papel Whatman 3MM previamente humedecidos con 2 x SSC y cortados del mismo tamaño que el filtro. Nuevamente se cuidaba de no dejar burbujas. Finalmente sobre el papel filtro se ponían toallas de papel absorbente (10 cm espesor), presionando el papel con un libro u objeto parecido de

un peso aproximado de 500 g. Para prevenir un corto circuito entre las toallas de papel y el papel 3MM que está bajo el gel, el gel era rodeado con plástico. Se dejaba que el DNA se transfiriera durante la noche, y se sacaba el filtro de nitrocelulosa marcando con lápiz de grafito la orientación del gel y los carriles correspondientes a las diferentes muestras. Se secaba el filtro a temperatura ambiente sobre un papel 3MM y se ponía en un horno a 80°C durante 2 horas. El filtro se enfriaba a temperatura ambiente y se procedía inmediatamente con la hibridación, o se guardaba al vacío envuelto en papel 3MM y papel de aluminio.

La hibridación se realizaba básicamente como está descrito por Maniatis *et al.* (1982). El filtro de nitrocelulosa se humedecía con una solución de 6 x SSC, y se deslizaba en una bolsa de plástico que podía ser sellada y calentada. Se añadían 0,2 ml de solución de prehibridación por cm<sup>2</sup> de filtro precalentada a 68°C. Esta solución consistía en SSC (6x), SDS (0,5%), solución de Denhardt 5x (0,1% ficol, 0,1% polivinil pirrolidona y 0,1% de fracción V de BSA) y 100 µg/ml de DNA desnaturalado de espermios de salmón. La bolsa era sellada cuidando de no dejar burbujas en su interior, y se sumergía en un baño con agitación a 68°C durante 2 a 4 horas. Después se retiraba la solución de prehibridación de la bolsa, y se reemplazaba por la solución de hibridación, también precalentada a 68°C, y en un volumen de 0,05 ml/cm<sup>2</sup> de filtro. La solución de hibridación consistía en SSC (6x), EDTA (0,01 M), solución de Denhardt (5x), SDS (0,5%), 100 µg/ml de DNA desnaturalado de espermios de salmón y el DNA-sonda (en este caso de P4), desnaturalado y marcado con <sup>32</sup>P (6 µCi), con una radiactividad específica aproximada de 30 µCi/µg de

DNA. Nuevamente se sacaban las burbujas del interior de la bolsa, y se incubaba en un baño con agitación a 68°C durante toda la noche. Posteriormente el filtro era lavado con una solución que contenía SSC (2x) y SDS (0,5%) a temperatura ambiente durante 5 min. El filtro se transfería a una solución de SSC (2x) y SDS (0,1%) a temperatura ambiente por 15 min. Finalmente, el filtro se incubaba en una solución de SSC (0,1x) y SDS (0,5%) a 68°C con agitación durante 2 horas con un cambio de esta solución, e incubación adicional de 30 min. El filtro era secado a temperatura ambiente sobre papel 3MM, montado sobre este mismo papel y envuelto en plástico para la exposición autoradiográfica. Para esto se utilizaba una película Kodak XAR-5 para rayos-X, que se exponía con el papel que sostenía el filtro. El revelado de esta película se hizo usando la solución reveladora y fijadora para película Kodak de rayos-X. Cuando era necesario, la cuantificación de las bandas se hacía usando un densitómetro Joyce-Loeb con registrador. La integración de los picos se hacía usando un planímetro Numonics 2000.

La preparación del DNA-sonda radiactivo se hacía siguiendo las instrucciones de BRL para el método de reparación inducida por corte. La siguiente mezcla de reacción se incubaba a 15°C durante 60 min en un volumen final de 0,2 ml : Tris-HCl 55 mM, pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 8 unidades de DNA polimerasa I, 800 pg de DNasa I, Mg-acetato 0,5 mM, PMSF 10 µM, glicerol 5%, 2-mercaptoetanol 10 mM, 20 µg/ml de BSA libre de nucleasas, dCTP 20 µM, dGTP 20 µM, dTTP, 20 µM, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP 3,2 µM con una radiactividad específica de 410 Ci/mmol, y 4 µg de DNA del fago P4. La reacción se detenía llevando la mezcla a una concentración final de 30



mM EDTA. La separación del DNA marcado del nucleótido radiactivo se hacía a través de una columna de 10 ml de Sephadex G-50. El rendimiento de la reacción de marcación de DNA era usualmente de un 40%, y la radiactividad específica del DNA marcado oscilaba entre 25 a 30  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  de DNA. La desnaturación de éste u otro DNA se hacía calentándolo a 100°C por 5 min, y enfriando rápidamente en una mezcla de hielo fundente.

#### *DETERMINACION DE LISIS CELULAR DESPUES DE INFECTAR CELULAS PORTADORAS DE pP4 Y SUS DERIVADOS CON P2*

Las células eran crecidas hasta una densidad de  $2 \times 10^8$  cél/ml en MLBG a 37°C e infectadas con P2 o mutantes de P2 a una multiplicidad de infección entre 5 y 10. La absorción se dejaba proceder durante 10 min a temperatura ambiente, y el cultivo era diluido 5 veces en MLBG precalentado a 37°C (tiempo 0). Se incubaba en un baño a 37°C con agitación y se tomaban lecturas cada 10 min en un fotocolorímetro Klett-Summerson.

#### *EXPERIMENTOS DE EXPLOSION DE FAGOS*

Las cepas de *E. coli* portadoras de pP4 eran crecidas en el medio apropiado hasta una densidad de  $2 \times 10^8$  cél/ml. Cuando era necesario, se agregaba Mg y Ca en las concentraciones ya descritas para la absorción de P2. Las células eran infectadas con P2<sub>vir1</sub>, o mutante derivada a una multiplicidad de infección de 5 a 10, incubadas a temperatura ambiente por 7 min, seguido de la adición de antiP4 ( $K=5 \text{ min}^{-1}$  final), con un periodo adicional de incubación de 5 min para inactivar el fago no adsorbido (La constante de inactivación K, está definida por la

siguiente expresión:

$$K = (2,3D/t)\log_{10}(P_0/P)$$

donde D es el factor de dilución, t el tiempo en minutos, P la concentración de fagos a tiempo t, y  $P_0$  la concentración inicial de fagos). Estos cultivos eran diluidos inmediatamente  $10^4$  veces en MLBG precalentado a 37°C, el que no contenía Ca y se le había adicionado 0,008% de EDTA. Se incubaba durante 90 min en un baño con agitación a 37°C. Los centros infectivos eran determinados plaqueando una muestra de las células infectadas en la cepa indicadora apropiada inmediatamente después de la dilución de  $10^{-4}$ . El número de fagos no adsorbidos era determinado mediante la adición de estreptomicina (300 µg/ml), para matar las células infectadas. Los fagos libres se determinaron plaqueando con una cepa indicadora resistente a estreptomicina. La explosión de fagos era medida plaqueando muestras de las células infectadas diluidas después de 90 min de la infección.

#### *SEPARACION DE LOS FAGOS P2 Y P4 MEDIANTE GRADIENTES ISOPICNICAS DE CsCl*

Para determinar el tamaño de las cápsides de P4 liberadas de una cepa portadora del plasmidio después de la infección con P2, se seguía el siguiente diseño experimental: Cultivos en fase exponencial de crecimiento ( $2 \times 10^8$  cél/ml) eran infectados a una multiplicidad de infección de 10 con P2vir1. La adsorción procedía por 10 min a temperatura ambiente, y luego las células se incubaban en un baño con agitación a 37°C. Se medía la densidad óptica con un fotolorímetro Klett-Summerson. Antes que la lisis celular se produjera, se agregaba

EDTA a una concentración final de 2 mM. Cuando la lisis celular se completaba, se centrifugaba a 7.000 g de modo de extraer los restos celulares, y el sobrenadante se filtraba a través de un filtro Millex de 0,45  $\mu$ . Se añadía  $MgCl_2$  de modo de alcanzar una concentración extra de 40 mM, para estabilizar P4. A 5 ml de esta suspensión se le agregaban 2,4 g de CsCl, y se centrifugaba a 35.000 rpm durante 72 horas en un rotor SW 50.1. Se fraccionaba cada gradiente y se titulaba para P2 y P4. La densidad de CsCl se determinaba usando un refractómetro.

#### *ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE pP4*

La cepa C3103 y sus derivadas que llevan plasmidios de P4 eran crecidas en LBG a 37°C, hasta una concentración de  $2 \times 10^8$  cél/ml. Las células eran concentradas 10 veces mediante centrifugación a baja velocidad, lavadas 2 veces con medio LX a 4°C, e irradiadas con luz ultravioleta con una lámpara Sylvania G15T8 a una energía de 20 J/m<sup>2</sup>. Las células eran diluidas 10 veces en LX e incubadas 90 min a 37°C. Las células que iban a ser infectadas con P4 se ponían en hielo inmediatamente después de la irradiación. La cepa C3103 era infectada con P4 a una multiplicidad de infección de 10, se dejaba 10 min en hielo para la adsorción del fago, luego era diluida 10 veces en medio LX precalentado, e incubada durante 90 min a 37°C. Después de este periodo de preincubación, se tomaban alícuotas de 0,2 ml y se marcaban con 125  $\mu$ Ci/ml de [<sup>35</sup>S]-metionina. Después de cinco minutos de la adición de la marca, se detenía la incorporación de metionina radiactiva añadiendo 0,1 ml de mezcla 3x (Tris-HCl 0,19 M pH 6,8, SDS 6%, glicerol 30%, 2-mercaptoetanol 15%, azul de bromofenol 0,003%) y poniendo la muestra en

hielo. Estas muestras se preparaban para la electroforesis en SDS-poliacrilamida hirviéndolas durante 1,5 min. La cantidad de material ácido-insoluble de cada muestra se determinaba depositando 5  $\mu$ l en filtros de papel Whatman 3MM. Los discos se sumergían en un exceso de TCA helado al 10% durante 60 min, se enjuagaban con un exceso de acetona durante 20 min, y se secaban al aire. Cada disco se puso en 3 ml de líquido de centelleo para ser contados.

Para visualizar las proteínas producidas por P4, se usaba el sistema de electroforesis en placa discontinua en SDS-poliacrilamida descrito por Laemmli (1970), con las siguientes modificaciones: Se preparaban geles de 17 cm en gradiente lineal de 7,5 a 15% de acrilamida usando un fabricante de gradientes exponenciales Hoeffer XPO77. La cantidad de TEMED y persulfato de amonio añadida era reducida a la mitad, de modo de prevenir una polimerización prematura. El tiempo de vaciado del gel era entre 5 a 10 min. El gel concentrador de muestra al 4% de poliacrilamida (1,5 cm), era vertido sobre el gel separador. El volumen de muestra era entre 20 y 40  $\mu$ l, y se corría la electroforesis a 80 V hasta que el colorante entraba en el gel separador (1 hora), y después a 180 V hasta que el colorante llegaba hasta el fondo del gel (9 a 11 horas). Los geles eran fijados en TCA 10% durante 30 min, y después eran sumergidos en una solución etanol:ácido acético:agua en una proporción de 5:2:13 durante otros 30 min. Los geles eran secados y se les hacía autoradiografía con una película Kodak XAR-5 para rayos-X.

### TRANSFORMACION CON DNA DE PLASMIDIO

El DNA a usar era previamente cortado con enzimas de restricción y ligado con DNA ligasa de T4. Previo a ligar el DNA deseado, se verificaba la digestión del DNA mediante geles de agarosa. Se trataba la suspensión de DNA con igual volumen de cloroformo de modo de extraer las proteínas, y se precipitaba el DNA de la fase acuosa con acetato de sodio y etanol, de un modo similar al descrito en la preparación de DNA de plasmidio. Se resuspendía el precipitado en amortiguador TE, y se determinaba la concentración de DNA por comparación con estándares en placas de agarosa con bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Las condiciones de ligamiento de DNA eran las siguientes: Tris-HCl 66 mM, pH7,5, MgCl<sub>2</sub> 6,6 mM, DTT 10 mM, ATP 0,4 mM, DNA 10 µg/ml (los fragmentos que se deseaban ligar en concentración equimolar), alrededor de 1 unidad de ligasa de T4, y se dejaba proceder la reacción durante la noche a 4°C. Después de este procedimiento el DNA estaba listo para la transformación.

La preparación de células competentes se hacía de manera similar a la descrita por Davis *et al.*, (1980): las células a transformar eran crecidas durante la noche hasta una alta densidad en medio LB. Eran diluidas 100 veces en el mismo medio, en un volumen final de 40 ml. El cultivo se crecía en un baño con agitación hasta una densidad óptica de 0,6-0,7 a 600 nm. Las células se centrifugaban a 6.000 g durante 5 min, se resuspendían en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,05 M y se dejaban en hielo por 1 hora. Se centrifugaban nuevamente a 6.000 g durante 5 min, se resuspendían en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,05 M y se dejaban en hielo entre 1 y 2 horas. Se mezclaba (en hielo) 0,1 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7,2, 0,1 ml

de células, y aproximadamente 0,1 µg de DNA, dejándose en hielo durante 30 min. Posteriormente, esta mezcla se incubaba a 37°C durante 5 min, se agregaban 2 ml de LB, y se incubaba a 37°C con agitación durante 30 a 40 min. 0,1 a 0,2 ml de esta suspensión sin diluir eran plaqueadas en medios selectivos. Si se quería obtener fagos en vez de células transformadas, se agregaba medio MLBG en vez de LB, y luego de incubar durante 30 min a 37°C, se agregaba P2 a una multiplicidad de infección de 10. Después que se observaba lisis celular, se plaqueaba con una cepa indicadora para P4.

#### *ENSAYO DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDÁSICA*

Se siguió el procedimiento descrito por Miller (1972). Las células eran crecidas en el medio deseado hasta que alcanzaban una densidad óptica de 0,4-0,8 a 600 nm (fase exponencial). Se centrifugaban a 7.000 g durante 5 min y se resuspendían en medio FB. Se dejaban 30 min en hielo y se tomaba una alícuota (0,1-0,9 ml) completándose a 1 ml con amortiguador Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,06 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,04 M, KCl 0,01 M,  $\text{MgSO}_4$  0,001 M, DTT 0,01 M, pH 7,0). Se añadían 2 gotas de cloroformo y 1 gota de SDS 0,1%. Se agitaba durante 10 segundos, y se preincubaba a 28°C durante 5 min. Se agregaba 0,2 ml de DNPG 4 mg/ml precalentado a 28°C y este era el inicio de la reacción. La reacción se detenía agregando 0,5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. Las muestras eran centrifugadas en una microcentrifuga durante 5 min, y se tomaba cuidadosamente parte del sobrenadante (de este modo se prevenía una lectura errónea producida por dispersión de luz). Se medían las densidades ópticas de las muestras a 420 nm (color) y 550 nm (dispersión de luz). El cálculo de unidades se hacía como está



descrito por Miller (1972), usando la siguiente expresión:

$$\text{unidades} = 1.000(A_{420} - 1,75A_{650})/t \times v \times A_{600}$$

donde  $v$  es el volumen de células usadas,  $t$  es el tiempo de reacción en minutos y  $A_{600}$  es la densidad óptica que alcanzaban las células en medio PB.

#### TRANSDUCCION CON EL FAGO P1

Se usó este método para transducir el gen  $trpR^+$  a una cepa que tiene defectivo este gen. El lisado de P1 usado provenía de células en las cuales el elemento de inserción Tn10 (el que lleva un gen que confiere resistencia para tetraciclina) está cerca del gen  $trpR$ , seleccionándose para resistencia a tetraciclina. Las células resistentes a tetraciclina se analizaron en cuanto a su capacidad de represión del operón del triptófano en presencia de triptófano. El procedimiento de transducción está descrito por Miller (1972). Se crecían las células que se deseaban transducir en LB durante la noche. Se centrifugaban y se resuspendían en el mismo volumen de MC ( $MgCl_2$  0,01 M,  $CaCl_2$  0,005 M) agitándose a 37°C durante 10 min. A 0,1 ml de células se agregaban 0,1 ml de fagos (sin diluir, diluidos 10 y 100 veces). Se incubaba durante 20 min a 37°C. Se agregaba 0,2 ml de citrato de sodio 1 M y se plaqueaba en placas selectivas. Las colonias que eran resistentes a tetraciclina eran replicadas en placas que contenían 5-metilriptófano, un análogo del triptófano que impide el crecimiento celular de cepas  $trpR^+$ .

## RESULTADOS

### PROPIEDADES BASICAS DEL PLASMIDIO P4

Para caracterizar las propiedades de pP4 se usaron los criterios habituales como son número de copias, replicación y estabilidad. El problema acerca de la estabilidad del plasmidio será tratado en la sección siguiente, así como las funciones de P4 que afectan la mantención del plasmidio. La replicación del plasmidio se miró bajo dos puntos de vista: funciones del huésped que afectan la replicación de pP4 y las funciones de pP4 que influyen en su propia replicación.

*Determinación del número de copia de pP4.* Goldstein et al., (1982), han descrito que la mutación *vir1* de P4 permite su propagación como plasmidio. Como un primer control se analizó el lisado celular de la cepa huésped que llevaba pP4, y esta misma cepa lisogénica para P4 de tipo silvestre (*wt*), a través de gradientes isopícnicas de CsCl-yoduro de propidio. En la figura 1 se muestran los perfiles de incorporación de [6-<sup>3</sup>H]-timidina en el DNA de la cepa C1a (huésped) y C1a(P4*wt*) (lisógeno). En ambos casos sólo se observa incorporación de cuentas en el DNA cromosomal, y no se detecta incorporación en la región de más alta densidad correspondiente a una forma superenrollada de DNA. Más adelante se mostrarán otros criterios para descartar la presencia de plasmidio en el caso del lisógeno.

Se construyó una cepa que porta pP4 como se describió en Materiales y Métodos. Al analizar el número de copias de pP4, se encontró que éste es dependiente de las condiciones de crecimiento celular (Lagos y

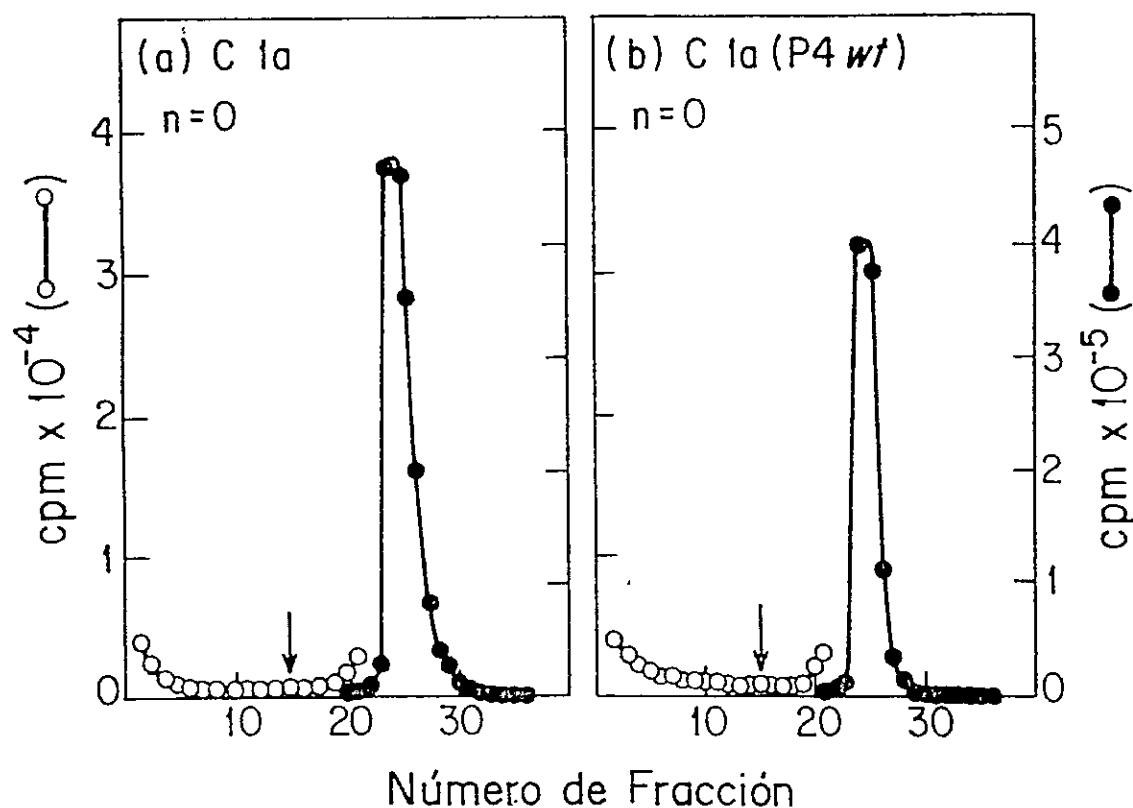


Figura 1. Análisis de las formas de DNA de las cepas C1a y C1a(P4wt) mediante centrifugación al equilibrio en CsCl. Los experimentos se realizaron como se describió en Materiales y Métodos, mediante la centrifugación en gradientes de CsCl-yoduro de propidio de lisados celulares de la cepa huésped C1a y la cepa lisogénica C1a(P4wt). Las células se crecieron en medio LB-glucosa con abundante oxigenación a 37°C. La escala de la izquierda (círculos abiertos) representa la incorporación de [6-<sup>3</sup>H]-timidina en la región en la cual se ubica el plasmidio. La escala de la derecha (círculos llenos) representa la incorporación de [6-<sup>3</sup>H]-timidina en la zona en que migra el cromosoma bacteriano. Estos mismos símbolos serán usados en todas las figuras en que se muestren gradientes similares a éste. La flecha indica la fracción aproximada en la cual se espera el pico del plasmidio. Aliquotas de cada fracción se ensayaron como cuentas precipitables con ácido tricloroacético. El incremento en la densidad es de derecha a izquierda. El panel de la izquierda (a) corresponde a la cepa C1a la cual se usó de huésped de pP4 y mutantes derivadas. El panel de la derecha (b) corresponde a la cepa lisogénica de P4 de tipo silvestre, que porta sólo la forma integrada del virus P4. n representa el número de copias.

Goldstein, 1984). El número de copias de pP4 depende al menos, de la temperatura, aireación del cultivo, glucosa y concentración de sales. En la figura 2 se muestra un resumen de las condiciones de crecimiento que alteran drásticamente el número de copias: bacterias crecidas durante la noche en medio LB glucosa con aireación a 30°C, ó, células cultivadas durante la noche en LB glucosa sin aireación a 37°C, ó, células cultivadas durante la noche en LB con aireación a 37°C, presentaban un número de copias entre 1 y 2. Sin embargo, cuando las células se cultivaban durante la noche en medio LB glucosa con aireación a 37°C el número de copias era de 48. Se encontró además que altas concentraciones de sales afectaban el número de copias: bacterias crecidas en las condiciones de número alto de copias, pero con una concentración extra de 0,45% de NaCl en el medio (normalmente presente cuando se crece el fago P4), presentaban un número de copias intermedio de 10-15 (no se muestra). Este efecto resultó ser inespecífico, ya que se obtuvieron resultados similares usando el mismo porcentaje de otras sales como Tris y fosfato (no se muestra). Esta propiedad de pP4 permite su propagación en número de copias alto, intermedio, o bajo, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Para probar si este era un fenómeno general aplicable a otros plasmidios, se transformó la misma cepa huésped con pBR325, y se creció bajo diferentes condiciones. Se encontró que el número de copias de pBR325 es independiente de las condiciones de crecimiento (no se muestra). Esto indica que la manipulación del número de copias del plasmidio a través de las condiciones de crecimiento, es una propiedad del sistema pP4.

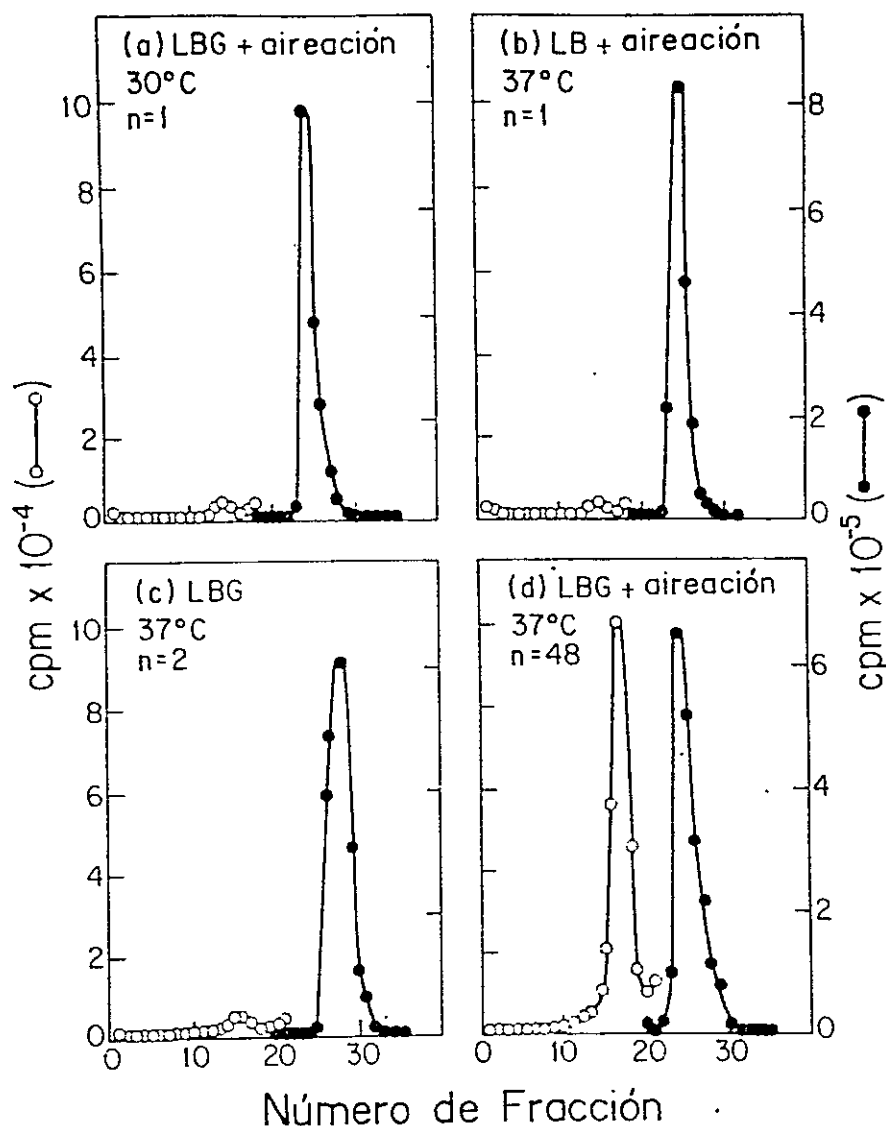


Figura 2. Alteraciones en las condiciones de crecimiento permiten un control inducible del número de copias de *pP4*. Los gradientes de densidad al equilibrio de  $\text{CsCl}$ -yoduro de propidio se obtuvieron como se describió en Materiales y Métodos y en la figura 1. La cepa  $\text{Cl}a(\text{pP4vir}1)$  se creció en: LB-glucosa (0,4%) (LBG) con aireación a  $30^\circ\text{C}$  (a); LB sin glucosa con aireación a  $37^\circ\text{C}$  (b); LBG sin aireación a  $37^\circ\text{C}$  (c); y LBG con aireación a  $37^\circ\text{C}$  (d).  $n$  es el número de copias por cromosoma equivalente. Al igual que en la figura 1, la escala de la izquierda (círculos abiertos), representa la incorporación de radiactividad en la zona de migración del plasmidio, y la escala de la derecha (círculos llenos), la zona en que migra el cromosoma bacteriano.

Se hizo un estudio más detallado de la dependencia del número de copias con la temperatura, manteniendo las otras condiciones para alto número de copias. El efecto de temperatura sobre la replicación del fago P4 había sido mencionado anteriormente por Kahn y Hanawalt (1978), quienes informaron que no pudieron hacer experimentos de replicación del DNA de P4 en una cepa *ts* a 30°C. A pesar que no hay un estudio sistemático de la replicación del DNA del fago P4 a diferentes temperaturas, con esta información no es sorprendente encontrar que a 30°C la replicación del plasmidio es pobre. Como se muestra en la figura 3 a 34°C, pP4 se replica en número alto de copias el cual es similar a 37 y 42°C. No se analizó con más detalle cual era la temperatura restrictiva exacta, y cuando se deseaba usar temperatura como condición para obtener número bajo de copias, las células se crecían a 30°C. En un experimento preliminar se trató de determinar si se producía una inhibición rápida de la replicación del DNA de pP4 cuando las células se transferían desde 37°C a 30°C. Al transferir las células de 37 a 30°C durante tres generaciones el número de copias disminuyó en un 20% respecto del control a 37°C, lo que sugiere que no hay una actividad enzimática termosensible que participe directamente en la replicación del DNA de pP4.

Se analizó también en más detalle el efecto de glucosa sobre el número de copias. Mediante electroforesis en geles de agarosa (no se muestra), se determinó que con concentraciones de glucosa entre 0,05 y 0,1% el número de copias es bajo. Reemplazando glucosa por otras fuentes de carbono, como succinato, malato, glutamato y glicerol el número



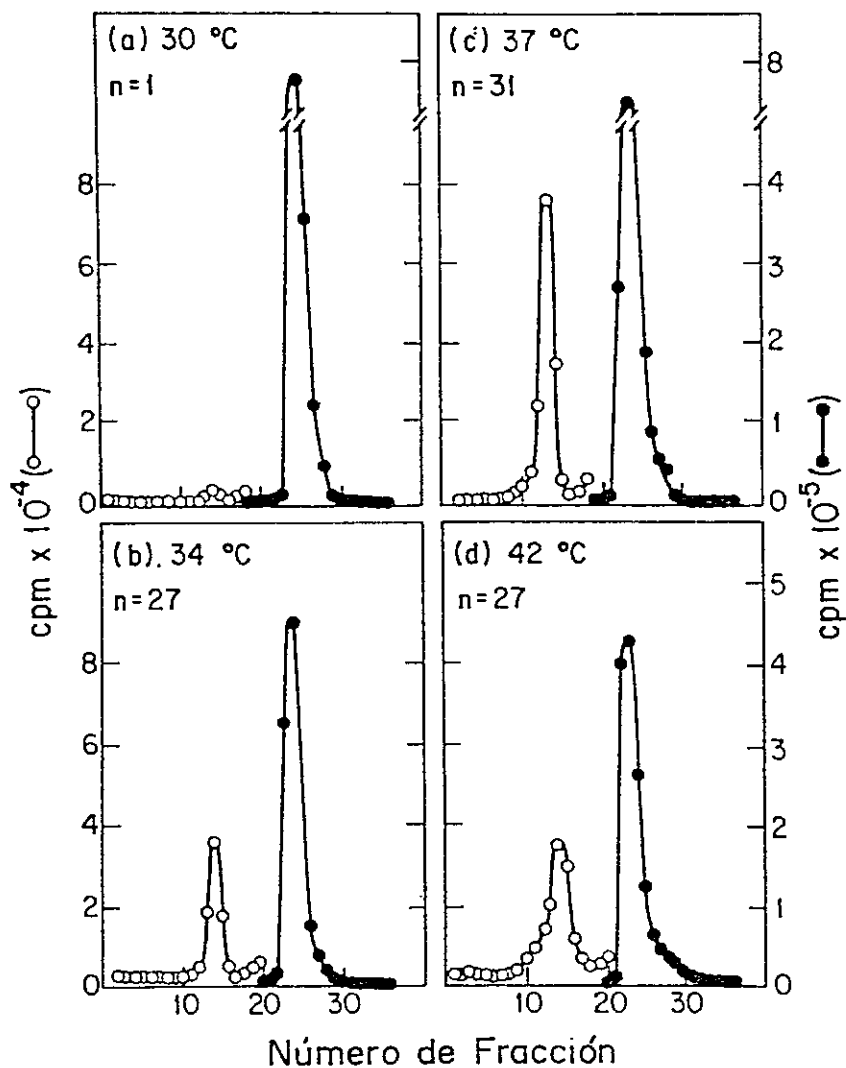


Figura 3. El número de copias de pP4 es dependiente de la temperatura. Los experimentos se realizaron como se describió en la figura 2. Cl<sub>a</sub>(pP4<sub>vir1</sub>) se creció en LBG con abundante oxigenación a: 30°C (a); 34°C (b); 37°C (c); y 42°C (d).

de copias era bajo. Si se usaba fructosa, piruvato o lactosa el número de copias se mantenía alto. A fin de estudiar si el efecto de glucosa era a nivel de represión catabólica, en la cual cAMP tiene un rol preponderante, se hicieron estudios en los cuales se agregaba cAMP y glucosa de modo de ver si se anulaba el efecto de glucosa. Se había descrito previamente que la presencia de cAMP estimulaba la respuesta lisogénica en lambda, y niveles bajos de este metabolito estimulaban la respuesta lítica (Hong et al., 1971; Grodzicker et al., 1972). Como P4 no puede entrar en ciclo lítico en ausencia de P2, el estado de número alto de copias podría analogarse al de ciclo lítico, y el de número bajo de copias al de lisogenia. En la figura 4 se muestra el efecto de cAMP en condiciones de crecimiento para número alto de copias, el cual se reduce a 3 en presencia de cAMP 10 mM. Reemplazando cAMP por AMP a la misma concentración, se obtiene un efecto intermedio, revelando que el efecto de cAMP es bastante específico. Estos resultados sugieren que glucosa tiene un efecto similar al descrito para la represión catabólica, ya que es antagonizado por cAMP.

Se establecieron nuevas cepas con pP4, usando fago P4 proveniente de otras preparaciones, y también P4 rescatado de la cepa pP4 mediante superinfección con P2. En todos los casos analizados (4), no hubo diferencias en el establecimiento y mantención del plasmidio P4, lo que indica que la propiedad de propagarse como un plasmidio con las características mencionadas no es adquirida (como podría ser una mutación en P4), sino una propiedad inherente de él.

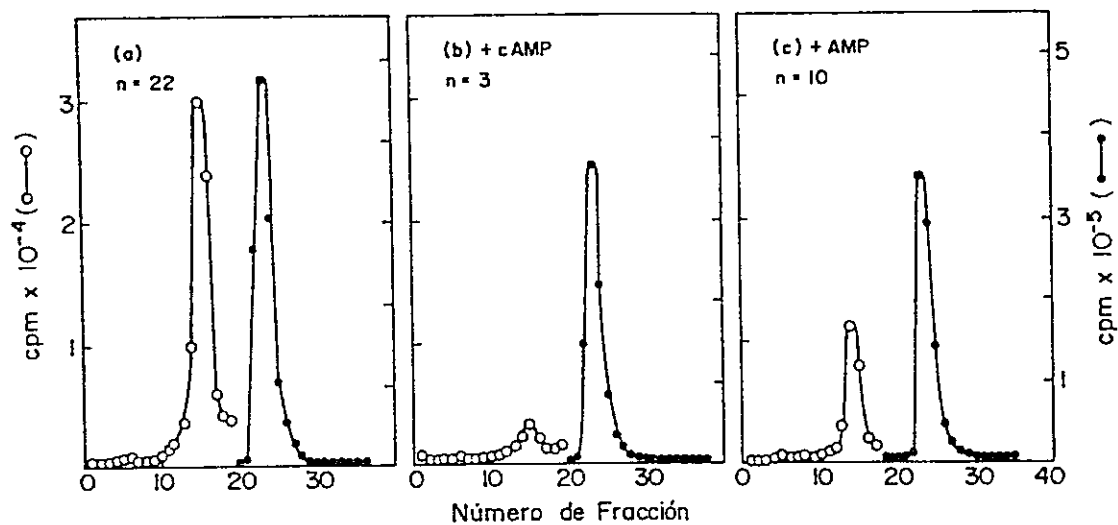


Figura 4. Efecto de cAMP sobre el número de copias de pP4. Los gradientes se obtuvieron como se describió en la figura 2. C1a(pP4vir1) se creció en LBG con aireación a 37°C (a); b) como en (a) pero en presencia de 10 mM de cAMP; c) como en (a) pero en presencia de 10 mM de AMP.

*Papel del producto génico  $\alpha$  sobre la mantención de pP4.* La replicación del DNA de P4 es dependiente del producto génico  $\alpha$ , que es codificado por P4, y se ha postulado que actúa como una DNA primasa esencial para la iniciación de la síntesis de DNA (Barrett et al., 1972; 1983). Para examinar el papel de  $\alpha$  en la mantención del estado de plasmidio, se estableció la mutante P4vir $\alpha$ ts61 en el huésped C1a a la temperatura permisiva de 37°C. Se analizó el número de copias de esta mutante crecida a diferentes temperaturas, en medio LBG con aireación, a través de gradientes isopícnicas de CsCl-yoduro de propidio. En la figura 5 se muestra que a las temperaturas permisivas de 30, 33 y 37°C el número de copias del plasmidio es bajo (1 a 3), mientras que a la temperatura no permisiva de 42°C no se detecta la presencia de la forma superenrollada del plasmidio. El número bajo de copias encontrado a 33 y 37°C contrasta con el número alto encontrado bajo las mismas condiciones en la cepa pP4vir  $\alpha^+$ . Esto puede ser atribuido a un efecto parcial de la lesión termosensible de la mutación  $\alpha$ ts61, aún a la temperatura permisiva. La replicación del plasmidio a 42°C de la cepa  $\alpha^+$  se mostró en la figura 3, en la cual se aprecia un número alto de copias, lo que indica que no hay un efecto de temperatura a 42°C sobre la replicación del plasmidio.

Se hicieron estudios preliminares de cambio de temperatura desde una permisiva (37°C), a una no permisiva (42°C), a fin de observar si se producía un cese inmediato de la replicación de pP4. Un cultivo a 37°C se transfirió durante 3 generaciones a la temperatura no permisiva, y no se observó un cese de la replicación de pP4 sino más bien una pequeña estimulación (n=6) (no se muestra). Este resultado será discutido más

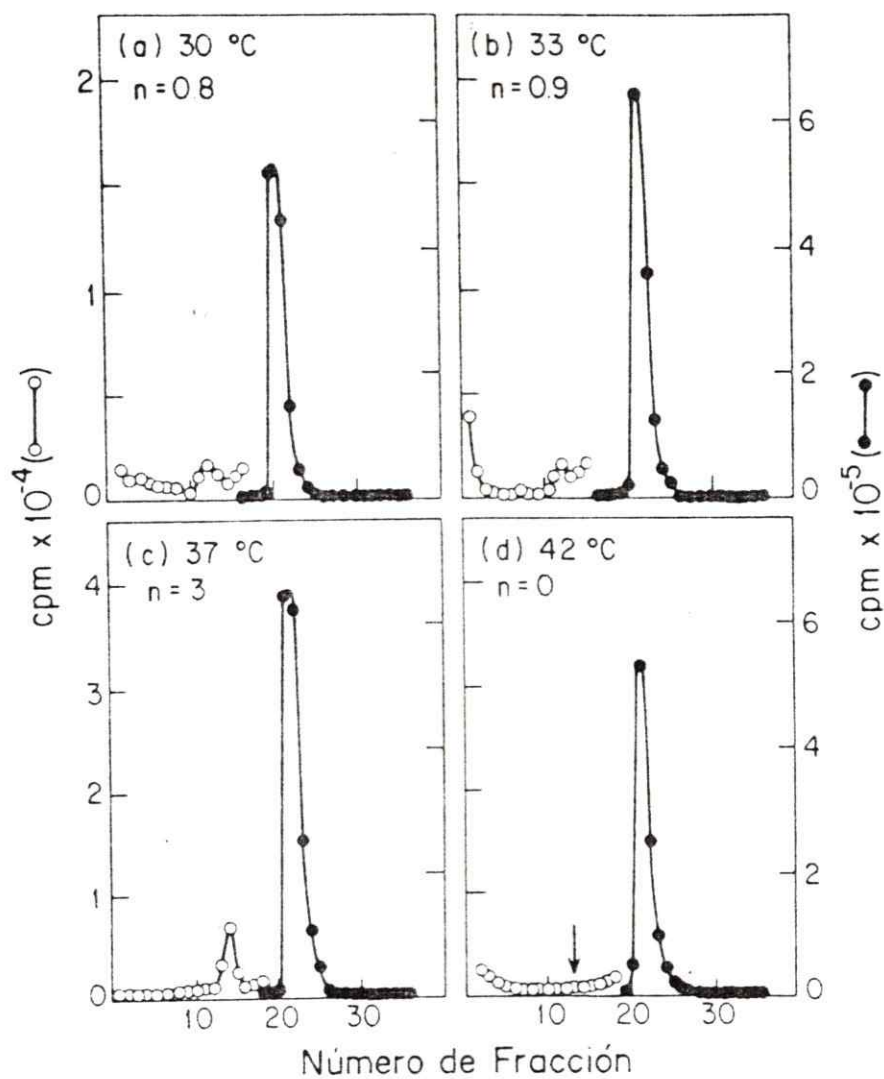


Figura 5. La replicación de pP4 $\alpha$ ts61vir1 es dependiente de la temperatura. Los experimentos se realizaron como se describió en la figura 3. Cl $\alpha$ (pP4 $\alpha$ ts61vir1) fue crecida a: 30°C (a); 33°C (b); 37°C (c); y 42°C (d).

adelante.

*Localización de pP4vir1ats61 en un huésped crecido a 42°C.* Se había demostrado previamente que células que contenían P4 en el estado de plasmidio, también tenían una copia de éste integrada en el cromosoma del huésped. Se investigó la posibilidad que existiera a 42° una copia integrada en el cromosoma, a pesar que se determinó que no existían copias de pP4 a esta temperatura no permisiva. Para probar la integración de pP4vir1ats61, se crecieron las células que portaban este plasmidio a 42°C y se preparó DNA total. El DNA celular total fue analizado por hibridación con DNA radiactivo de P4, luego de ser transferido a filtros de nitrocelulosa. Para demostrar que el DNA de P4 no está meramente atrapado en el DNA cromosomal, el DNA total fue tratado con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Se esperaba obtener que el patrón de fragmentos obtenidos sólo por integración fuera el mismo que el obtenido para *Cla*(P4wt); en cambio, si hay formas libres de P4 deberían obtenerse fragmentos adicionales.

La enzima *EcoRI* corta el DNA lineal de P4 aislado de cápsides del fago, en tres sitios, dando origen a cuatro fragmentos denominados A, B, C y D (Goldstein *et al.*, 1975) (figura 6a). En contraste, la molécula replicativa de DNA de pP4 es circular, porque los extremos cohesivos de los fragmentos A y D están covalentemente fusionados. La digestión con *EcoRI* de esta molécula circular, da origen a tres fragmentos: A+D, B y C (figura 6b). La integración de pP4 a través del sitio *att*, divide la molécula circular del plasmidio en el fragmento A+D en el sitio *att*, y los extremos libres del plasmidio, localizado en este sitio, se unen al



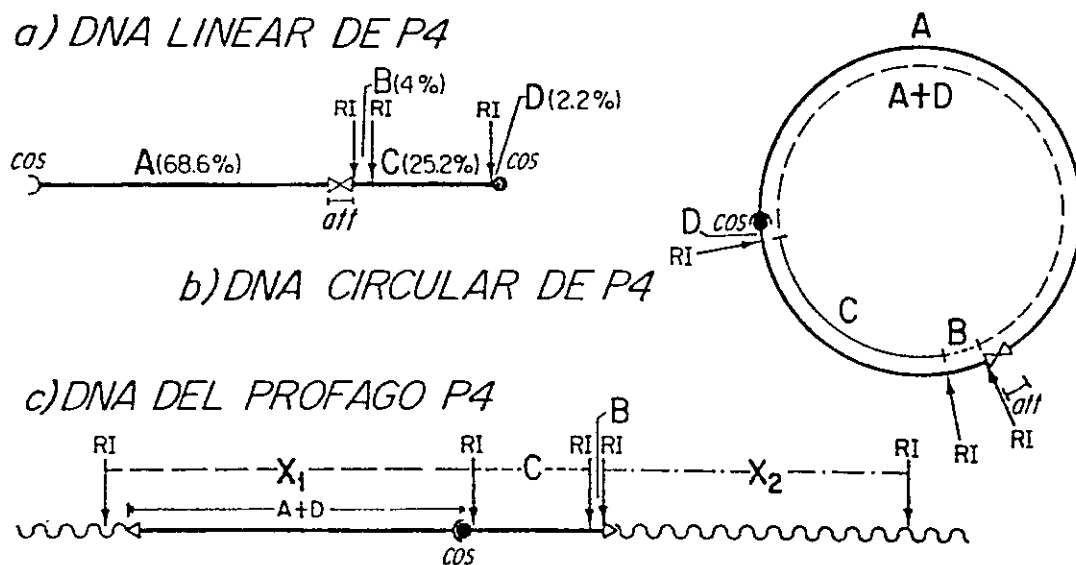


Figura 6. Mapa de restricción de P4 con la enzima *EcoRI*. a) La enzima *EcoRI* corta el DNA lineal del fago P4 en tres sitios, dando lugar a cuatro fragmentos llamados A (68,6%), B (4%), C (25,2%) y D (2,2%) (Goldstein *et al.*, 1976). b) En la forma circular de P4 los fragmentos A y D están fusionados a través de los extremos cohesivos, por lo que al digerir el DNA circular de P4 con *EcoRI* se originan sólo tres fragmentos, AD, B y C. c) Cuando P4 está integrado dentro del cromosoma, el fragmento AD se divide en dos (en el lugar en que se encuentra el sitio *att*) uniéndose por estos extremos al cromosoma bacteriano. Al digerir este DNA con *EcoRI*, el fragmento AD se reemplaza por dos nuevos fragmentos, X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>.

cromosoma del huésped. En esta configuración integrada de P4, el fragmento A+D de la forma circular del plasmidio es reemplazado por los fragmentos X1 y X2 (los fragmentos de unión con el huésped) en tanto que los fragmentos B y C no se ven alterados después de una digestión con *EcoRI* (figura 6c).

En la figura 7 se muestran los resultados después de digerir el DNA total con *EcoRI*, someterlo a electroforesis en geles de agarosa, transferencia a nitrocelulosa, e hibridación con DNA de P4 marcado con  $^{32}P$ . En esta figura se observa que *Cla*(pP4*vir*1*ats61*) crecida a 42°C contiene la forma integrada de P4, pero no contiene la forma circular libre del plasmidio de P4 (posición 8). El patrón observado es el mismo que para el lisógeno de P4*wt* (posición 1), en el cual se resuelven los fragmentos de unión con el cromosoma, X1 y X2, y los fragmentos B y C, en cambio el fragmento A+D producido por la forma circular del plasmidio está ausente. Todos estos fragmentos están presentes en esta misma cepa crecida a una temperatura permisiva (37°C) para el plasmidio (posición 7). Este es también el caso para *Cla*(pP4*vir*1) crecida bajo diferentes condiciones (posiciones 2, 3, 4 y 5). Estos estudios de hibridación dejan claro que el efecto de las condiciones de crecimiento sobre el número de copias del plasmidio se ejerce a nivel de la replicación del DNA. Esta conclusión no se extrae de los experimentos de gradientes isopícnicos, ya que existe la posibilidad que el efecto se deba a la formación de formas relajadas del plasmidio, las cuales migrarían con el DNA cromosomal. Si este fuese el caso, en las condiciones de bajo número de copias se esperaría encontrar una gran proporción del fragmento AD,

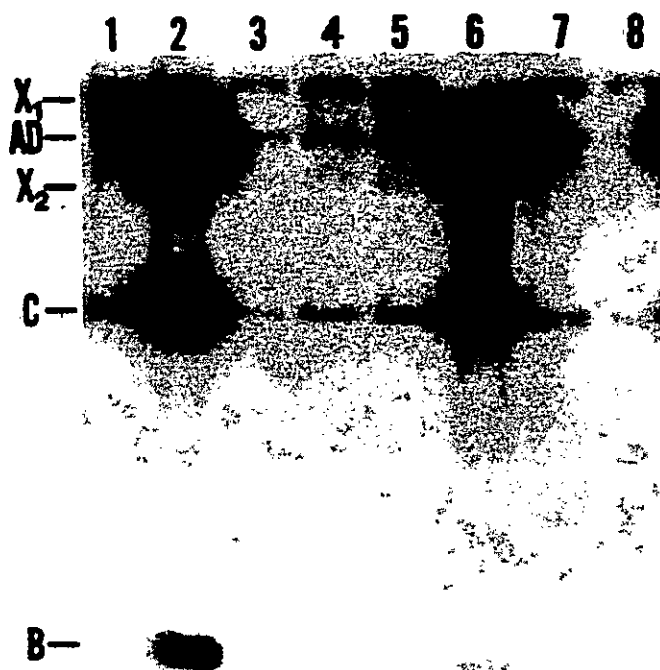


Figura 7. Hibridación por el método de Southern del DNA total digerido con *EcoRI* de células que portan pP4. Se extrajo el DNA total de las cepas *Cla*(pP4*vir1*) o *Cla*(pP4*vir1*Δ*ts61*) crecidas bajo diferentes condiciones (ver el texto). Los gels, transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa e hibridación, se hicieron como se describió en Materiales y Métodos. La posición 1 representa el lisógeno *Cla*(P4*wt*) crecido en medio LBG con aireación a 37°C (ver figura 2). *Cla*(pP4*vir1*) crecida en LBG con aireación a 37°C (2); como en 2 pero a 30°C (3); como en 2 pero sin aireación (4); como en 2 pero sin glucosa (5). 6 representa el DNA de pP4 purificado a través de gradiente de *CsCl*-bromuro de etidio. 7 y 8 son *Cla*(pP4*vir1*Δ*ts61*) crecido en LBG con aireación a 37°C y 42°C respectivamente. En las posiciones 1 y 8 el fragmento AD no está presente, aunque esta región se ve oscurecida por la sobreexposición de manchas adyacentes. Las figuras 22, 23 y 27 muestran *Cla*(P4*wt*) sin este problema. El fragmento X2 es visible sólo después de tiempos prolongados de exposición.

proveniente de la forma relajada del plasmidio enmascarada por el cromosoma. Por el contrario, se observa que el fragmento AD se encuentra en proporción 1:1 con el fragmento X1 (el cual es prácticamente todo el fragmento AD unido a un fragmento de DNA cromosomal), lo que además confirma el número de copias obtenido por el método de gradientes (posiciones 3, 4, 5 y 7). Esto se calculó por trazado densitométrico de la autoradiografía, y posterior integración bajo la curva de los picos. Desgraciadamente, no fue posible tener un dato exacto, por este método, de la condición de número alto de copias, de modo de tener una estimación del porcentaje de la forma relajada del plasmidio, ya que la banda correspondiente al fragmento AD es tan intensa que no permite un trazado densitométrico completo. Por triangulación de este pico, se obtienen proporciones similares a las obtenidas por experimentos con gradientes. Con seguridad se puede decir que al menos en condiciones de número bajo de copias, todas las células llevarían la forma integrada de pP4.

Con este razonamiento no se puede extrapolar la misma conclusión para la mutante *ots61*, crecida en las condiciones no permisivas (42°C), ya que no se tiene un patrón de comparación como es la forma integrada y el plasmidio. Sin embargo, el hecho de no obtener segregantes del plasmidio aunque las células se crezcan varias generaciones a la temperatura no permisiva, apoya la idea que siempre existe una copia integrada en el cromosoma a la temperatura no permisiva (no se muestra).

*Inducción del profago P4vir<sub>1</sub>ots61 al estado de plasmidio.* Los resultados que se mostraron anteriormente demuestran que después de cambiar la

temperatura desde 37 a 42°C, pP4vir1αts61 es mantenido en la forma integrada dentro del cromosoma del huésped. Un cultivo de C1a(pP4vir1αts61) crecido a 42°C, que sólo contiene la forma integrada de P4, fue transferido a 37°C durante la noche, y subsecuentemente diluido previo a la marcación con [6-<sup>3</sup>H]-timidina. En la figura 8 se muestra que cuando el cultivo es transferido desde la temperatura no permisiva (42°C) a la permisiva (37°C) para la replicación del plasmidio, hay una inducción de pP4. Las células pueden ser crecidas indefinidamente a 42°C sin pérdida de P4, obteniéndose el estado de plasmidio cuando se cambia a 37°C.

*Inhibición de la replicación del DNA por cloramfenicol y rifampicina.*

Como una primera aproximación para establecer cuan dependiente es la replicación del plasmidio de las funciones celulares, se hicieron estudios *in vivo* de la inhibición de la replicación del DNA de pP4 por cloramfenicol y rifampicina, para ver si la replicación dependía de la síntesis de proteínas y de RNA. La cepa C1a(pP4vir1) fue marcada con un pulso de [6-<sup>3</sup>H]-timidina durante 10 min con o sin la concomitante adición de cloramfenicol (100 µg/ml), ó rifampicina (100 µg/ml). El DNA del plasmidio covalentemente cerrado y superenrollado fue separado del DNA cromosomal mediante centrifugación al equilibrio en CsCl-yoduro de propidio. Como se muestra en la figura 9 la incorporación de [6-<sup>3</sup>H]-timidina durante los primeros 10 min del pulso no es afectada por la adición de los antibióticos, pero se observa un efecto considerable después que las células han sido tratadas con estos antibióticos por 60 min. En la Tabla I se muestran los porcentajes de inhibición de la

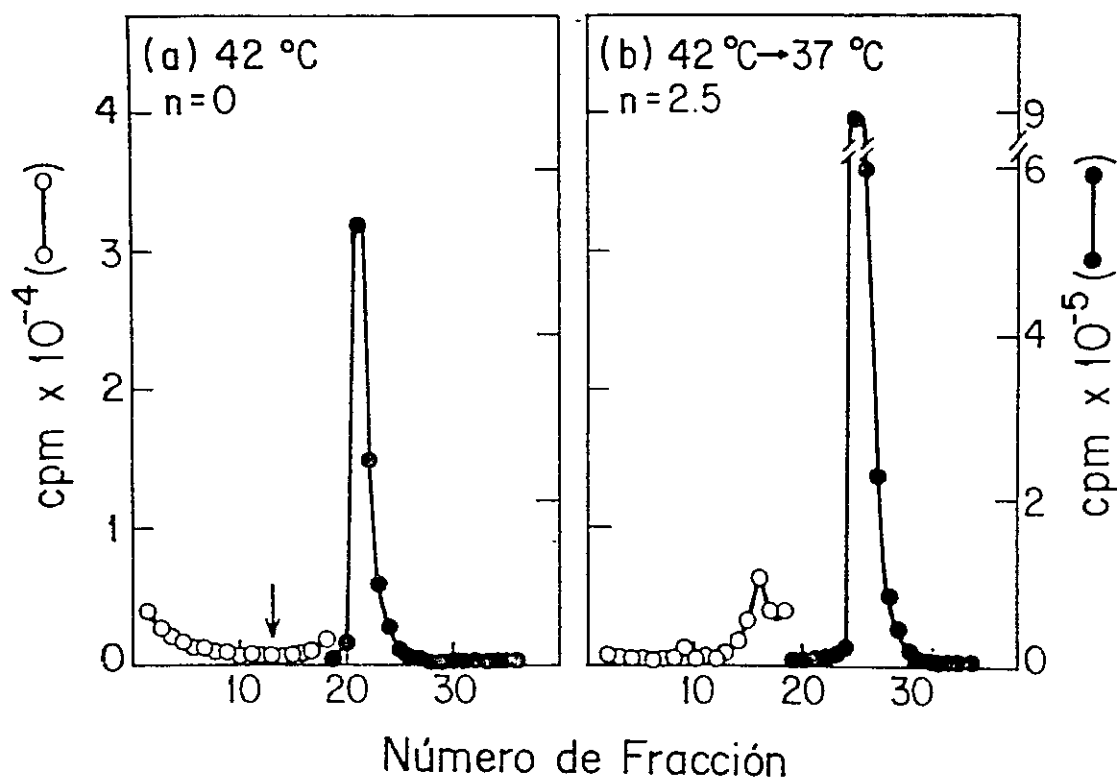


Figura 8. El cambio de temperatura desde 42°C a 37°C induce la forma integrada de P4αts61vir1 al estado de plásmido. Los experimentos se realizaron como se describió en la figura 2 y en Materiales y Métodos. Clα(pP4αts61vir1) se creció a 42°C (a), y luego se transfirió a 37°C durante 15 horas previo a la marcación con [6-<sup>3</sup>H]-timidina (b).



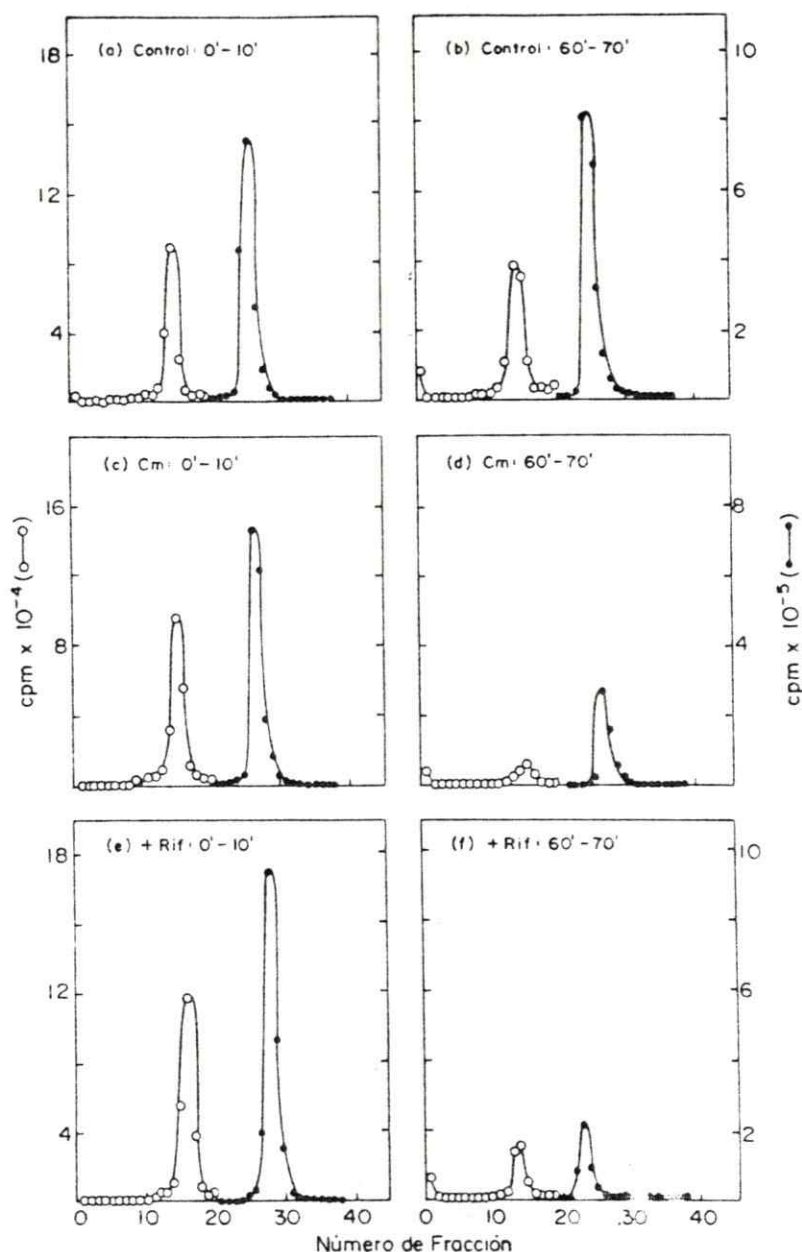


Figura 9. Inhibición de la replicación de pP4 por cloramfenicol y rifampicina. Los gradientes de CsCl-yoduro de propidio se realizaron como se describió en Materiales y Métodos. El DNA se marcó con [6-<sup>3</sup>H]-timidina durante 10 minutos sin la adición de antibióticos (a y b); con la adición de cloramfenicol (Cm) (c y d) a una concentración final de 100 µg/ml; y con la adición de rifampicina (Rif) (e y f) a una concentración final de 100 µg/ml. El tiempo 0 corresponde al momento de agregar el antibiótico y los tiempos señalados en el gráfico al periodo durante el cual se marcó el DNA (ver Materiales y Métodos).

TABLA I

*Efecto del cloramfenicol y rifampicina sobre la replicación de pP4 in vivo*

tiempo (min)	rifampicina			cloramfenicol		
	pP4	crm	crm/pP4	pP4	crm	crm/pP4
0-10	133%	109%	7,8	118%	104%	9,5
60-70	41%	22%	5,6	15%	27%	10,0

En esta tabla se presenta un resumen de los datos obtenidos en la figura 9. Los porcentajes de síntesis de DNA son relativos al control no tratado. El cálculo del porcentaje se hizo estimando el número total de cuentas incorporadas en el plasmidio (pP4) y en el cromosoma (crm). De modo de apreciar mejor el efecto de los antibióticos sobre la replicación de pP4, se hizo el cociente de las cuentas totales del cromosoma sobre el plasmidio (crm/pP4). Como se indicó en la figura 9, el tiempo 0 corresponde al momento de la adición del antibiótico, y el intervalo de 10 minutos al periodo durante el cual se hizo la marcación radiactiva.

síntesis de DNA del plasmidio y del cromosoma después de agregar la droga. Los niveles del plasmidio se reducen a un 15% después de un tratamiento de 60 min con cloramfenicol, en cambio sólo se reducen a un 41% después del tratamiento de 60 min con rifampicina. Eventualmente, con tratamientos por tiempos prolongados con estas drogas, se llegaba a una inhibición total de la síntesis de DNA (no se muestra). A fin de precisar que proteínas celulares están envueltas en la replicación del plasmidio, se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

*Funciones celulares que afectan la replicación de pP4.* Para hacer este estudio se contó con una serie de mutantes termosensibles en los genes *dna* implicados en la síntesis de DNA. Estudios previos de Bowden *et al.*, (1975) mostraron que la replicación del fago P4 era independiente de las funciones *dnaA*, B, C, y G, pero que dependía de los genes *dnaE* y H que codifican para la DNA polimerasa III. Se investigó si el plasmidio era dependiente de estas funciones, y en caso contrario, su posible complementación con éstas. Se estableció pP4 en cepas defectivas (*ts*) para funciones *dnaA*, B y G, trabajando a la temperatura permisiva (30°C). P4 tenía un efecto letal sobre la cepa *dnaC* (0,1% de sobrevivientes después de la infección con P4 a una multiplicidad de infección de 10. Ninguno de los sobrevivientes portaba pP4), por lo cual fue imposible establecer esta cepa. La mutante en la DNA polimerasa III escogida, fue una mutación en el gen *dnaE*, que codifica una subunidad de la holoenzima de pol III (Mc Henry y Kornberg, 1977). Se estableció pP4

en esta cepa a la temperatura permisiva. Los productos génicos *dnaA*, *B* y *G* están implicados en la iniciación de la replicación del DNA. El gen *dnaG* codifica para una primasa (Rowen y Kornberg, 1978), y formaría junto con los productos génicos *dnaB*, *C* y otras proteínas el "primosoma" (Kornberg, 1984), complejo que inicia la replicación del DNA. El producto del gen *dnaA* ha sido menos estudiado, pero se sabe que participa en la iniciación de la replicación del DNA en el origen de la replicación (Kornberg, 1982). pP4 no complementó para el crecimiento a la temperatura no permisiva (42°C) con ninguna de estas mutantes. Al igual que lo observado en *Cla*(pP4*vir1*), todas estas cepas presentaban una copia de P4 integrada en el cromosoma bacteriano. Para iniciar el estudio acerca de la participación de estas funciones en la replicación del DNA de pP4, se midió la síntesis total de DNA a la temperatura permisiva (30°C), observándose como ésta se afectaba cuando los cultivos eran transferidos a la temperatura no permisiva (42°C).

En la figura 10 se muestra la síntesis de DNA total de las mutantes *dna* termosensibles a la temperatura permisiva (30°C), y luego de ser transferidas a la temperatura no permisiva (42°C). El tiempo medio de duplicación celular de la cepa *dnaA*, con o sin el plasmidio, en las condiciones descritas para el experimento a 30°C, es de 45 min. En la figura 10a se observa que la curva de replicación del DNA a 30°C es idéntica en la cepa pP4 y en la cepa parental. Sin embargo, a la temperatura no permisiva el patrón de comportamiento es diferente. La replicación del DNA de la cepa control cesa después de 60 min de ser transferida a 42°C, dato que concuerda con el descrito en la literatura,

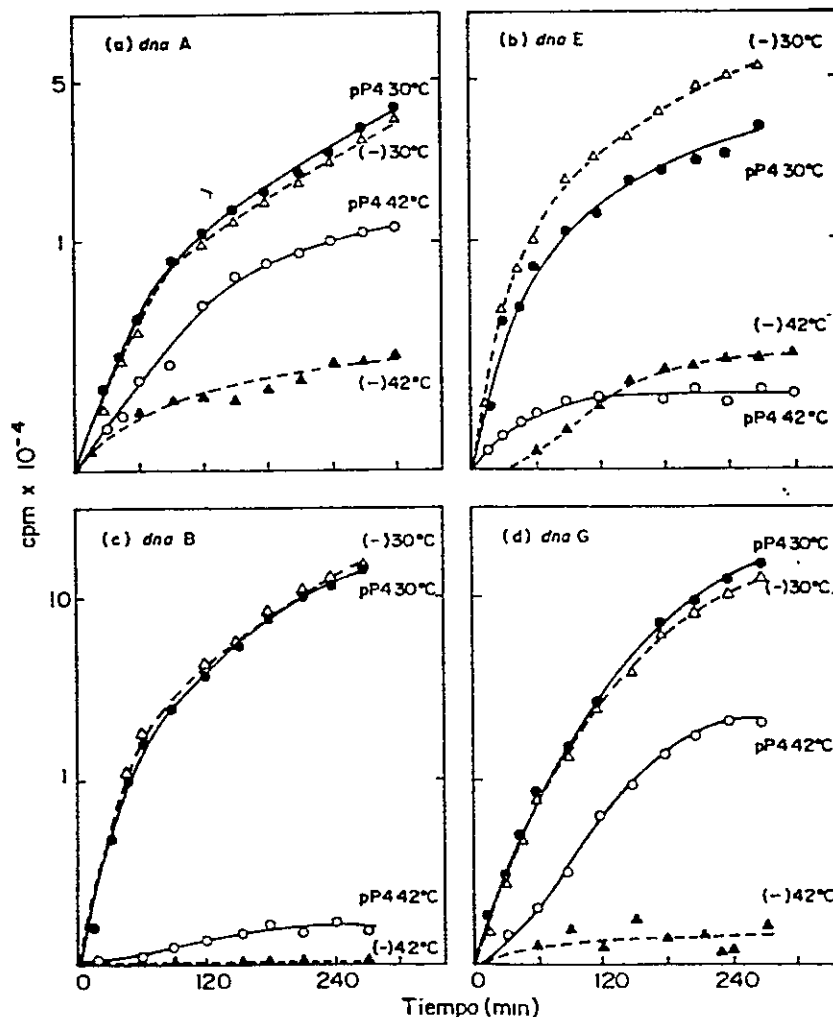


Figura 10. Síntesis de DNA total en cepas defectivas en funciones *dna* que portan pP4. Las determinaciones de síntesis de DNA se hicieron como se describió en Materiales y Métodos. La línea continua representa la cepa que porta pP4, y la línea punteada la cepa sin plasmidio. El tiempo 0 indica el momento de cambio de temperatura cuando corresponde. En cada panel se muestran la cepa sin plasmidio y la cepa que lleva pP4 crecidas a la temperatura permisiva (30°C) y transferidas a la temperatura no permisiva (42°C). Las cepas usadas fueron: a) C2307 (mutación en *dnaA*) y C2307(pP4*vir1*). b) LD301 (mutación en *dnaE*) y LD301(pP4*vir1*). c) LD312 (mutación en *dnaB*) y LD312(pP4*vir1*) y d) C2309 (mutación en *dnaG*) y C2309(pP4*vir1*). En la figura, (-) representa la cepa sin plasmidio.

ya que esta cepa es de detención lenta. Sin embargo, cuando esta cepa lleva pP4, la detención de la síntesis de DNA se produce después de 270 min de ser transferida a 42°C, y alcanza niveles de síntesis de DNA tres veces más altos que la cepa parental sin el plasmidio. Este resultado indicaría que pP4 puede pseudocomplementar por algún tiempo la función *dnaA*. Podría tratarse tanto de un reemplazo como una estabilización de esta actividad por los productos génicos de pP4.

El mismo experimento hecho para la mutante de *dnaB* se muestra en la figura 10c. En este caso, el tiempo de duplicación celular a 30°C de las cepas con o sin el plasmidio es de 105 min, y al igual que el caso anterior no hay diferencias en las curvas de síntesis total de DNA de ambas cepas a 30°C. Cuando estas cepas son transferidas a 42°C, en la cepa control (sin pP4) se produce una detención inmediata de la síntesis de DNA, lo cual está de acuerdo con datos de la literatura, ya que esta cepa ha descrito como de detención rápida. La síntesis de DNA de la cepa pP4 cesa después de 180 min de ser transferida a 42°C, pero los niveles de síntesis alcanzados son muy bajos, de modo que probablemente ésta correspondería a síntesis residual de DNA del plasmidio. Si este fuese el caso (como se analizará más adelante), se podría decir que la síntesis del DNA de pP4 es independiente de esta función.

En la figura 10d se muestra que sucede cuando se emplea una mutante en la DNA primasa (*dnaG*). El tiempo de duplicación celular a 30°C de las cepas con o sin plasmidio es de 60 min, y ambas cepas poseen el mismo patrón de síntesis de DNA total a 30°C. Esta cepa también ha sido descrita como de detención rápida, y efectivamente la síntesis de DNA

cesa inmediatamente cuando la cepa control es transferida a 42°C. Sin embargo, la cepa que lleva pP4 sintetiza DNA hasta alrededor de 180 min después de haber sido transferida a 42°C, alcanzando niveles de síntesis relativamente altos. Al igual que para la mutante *dnaA*, esto se podría explicar por una pseudocomplementación de pP4, ya que la cantidad de DNA sintetizado es mayor que la que uno esperaría sólo para el plasmidio.

Finalmente, en la Figura 10b se analiza el caso de la mutante *dnaE*. Esta cepa está considerablemente más alterada que las otras, lo que se refleja en parte en los tiempos de duplicación celular. La cepa control (sin pP4) tarda alrededor de 3 horas en duplicarse, siendo este tiempo un poco mayor para la cepa que lleva pP4. La cinética de síntesis total de DNA a 30°C es un poco más rápida en la cepa control. Algo similar sucede cuando ambas cepas son transferidas a 42°C. La síntesis de DNA se detiene alrededor de los 130 min después de la transferencia a 42°C, y los niveles de síntesis de DNA alcanzado por la cepa que porta el plasmidio son más bajos que la del control, aunque ambos niveles son relativamente bajos si se los compara con los niveles alcanzados a 30°C. Una explicación simple de estos resultados, es que pP4 requiere de pol III, y más aún, compite por este producto génico defectuoso lo cual ocasiona el descenso en los niveles totales de DNA de la cepa pP4. Como los datos presentados hasta aquí no permiten sacar una conclusión en ese sentido, se hicieron experimentos para cuantificar estos efectos a nivel del DNA del plasmidio y DNA cromosomal.



*Replicación del DNA del plasmidio y cromosomal bajo condiciones no permisivas de las mutantes dna.* La metodología seguida fue dar un pulso (10 min) de [6-<sup>3</sup>H]-timidina después de transferir las células por 120 min a la temperatura no permisiva. Se escogió este tiempo para dar el pulso, pues prácticamente en todos los casos, la síntesis de DNA de las cepas control (sin pP4) ha cesado casi por completo, a excepción de la mutante *dnaA* que es de detención lenta. En los casos de las cepas que portan el plasmidio, el tiempo que demora en detenerse la síntesis de DNA es mayor que 120 min, lo cual permite concluir que la síntesis de DNA producida posterior a este tiempo, es debido a un efecto producido por pP4. El análisis de las formas de DNA se hizo a través de gradientes isopícnicas de CsCl-yoduro de propidio, lo cual permitió resolver las contribuciones hechas por la síntesis de DNA del plasmidio y del cromosoma.

En la figura 11a se muestra el perfil de DNA de las cepas mutantes *dnaA* con o sin pP4 que se mantuvieron a 30°C. Como se esperaba, la cepa control sólo presenta síntesis de DNA cromosomal, mientras que la cepa pP4 lleva el plasmidio en número de copias igual a 6,6. Después de transferir estos cultivos a 42°C (figura 11b), se observa que la cepa control disminuye notablemente la síntesis de DNA cromosomal (alrededor de 10 veces), en cambio la cepa pP4 presenta un pequeño aumento de la síntesis de DNA de pP4 y del cromosoma. Esta última puede ser atribuida a que la masa celular aumentó al seguir creciendo las células por un tiempo. Para tener un parámetro relativo se calculó el cociente entre la incorporación de cuentas obtenidas en el DNA del cromosoma y en el

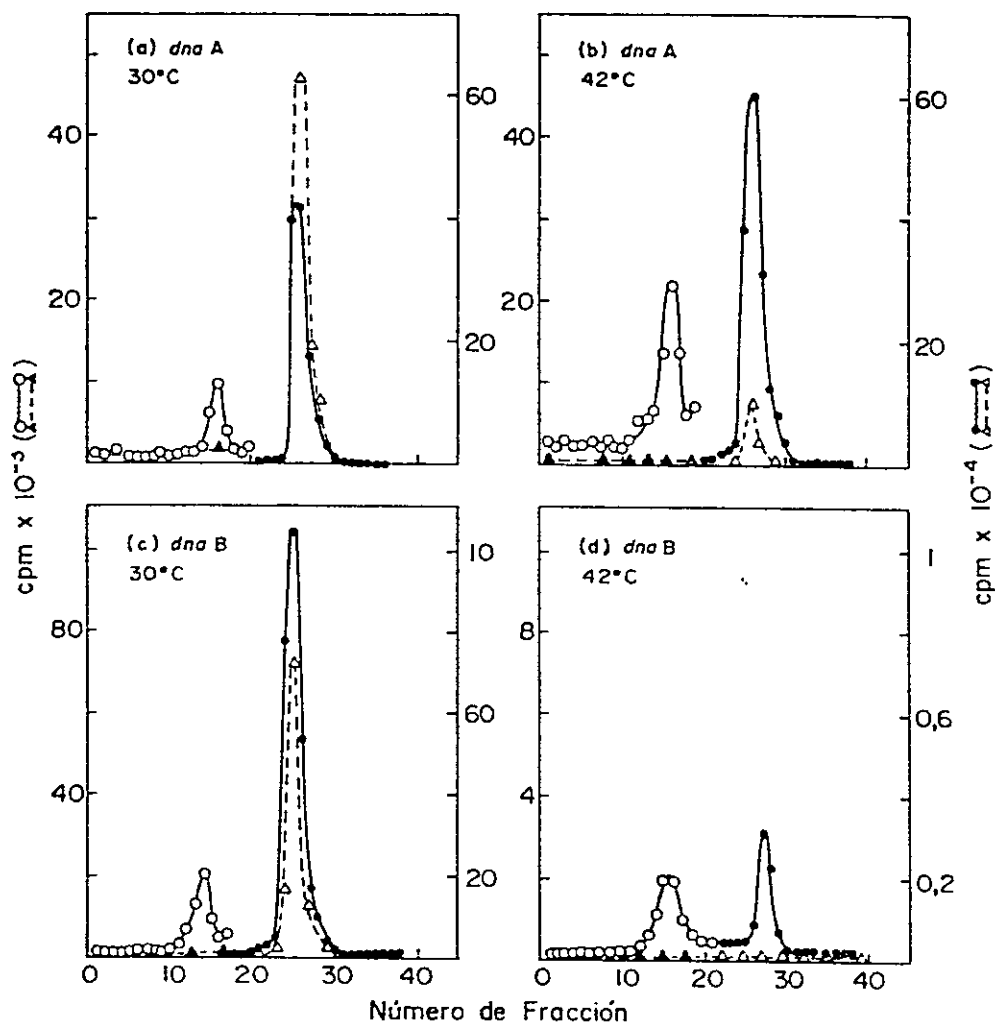


Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la síntesis de pP4 en cepas termosensibles en las funciones *dnaA* y *B*. Los gradientes en CsCl-yoduro de propidio se realizaron como se describió en Materiales y Métodos. La línea continua representa la cepa que porta pP4 y la línea punteada la cepa sin plasmidio. a) C2307 y C2307(pP4 $\text{vir1}$ ) (*dnaA* *ts*) crecidas a 30°C y marcadas con un pulso de [6-<sup>3</sup>H]-timidina durante 10 minutos. b) Como en (a) pero transferidas a 42°C durante 120 minutos previos a la marcación. c) LD312 y LD312(pP4 $\text{vir1}$ ) (*dnaB* *ts*) crecidas a 30°C y marcadas como en (a). d) Como en (c) pero transferidas a 42°C durante 120 minutos previos a la marcación.

plasmidio. En la Tabla II se muestra que el cociente disminuyó de 51 a 26, lo cual significaría que el plasmidio se sintetiza preferentemente sobre el cromosoma, ya sea porque la síntesis del plasmidio aumenta, o la del cromosoma disminuye, o una combinación de ambas. En todo caso, es evidente que la síntesis del DNA cromosomal es importante, lo cual implicaría que pP4 pseudocomplementa o estabiliza el producto génico *dnaA*. Por otra parte, se concluye que este producto génico no está implicado en la replicación de pP4, ya que éste se replica normalmente a la temperatura no permisiva. Como se mencionó anteriormente, no hay complementación total de pP4 en esta mutante, ya que la cepa pP4 no crece a temperaturas no permisivas.

En la figura 11c se muestra el comportamiento de la cepa *dnaB* con y sin pP4 a la temperatura permisiva. El número de copias de pP4 es de 7,4. Al transferir estos cultivos a 42°C (figura 11d), la síntesis del DNA cromosomal de la cepa control cesa completamente. El plasmidio se replica pobremente pero aún a niveles significativos, en cambio el cromosoma se replica a niveles casi insignificantes (disminuido en más de 300 veces). De estos experimentos se puede concluir que la replicación del DNA del plasmidio aún persiste en presencia del producto inactivo del gen *dnaB*, y que no hay pseudocomplementación de esta actividad. En la Tabla II se aprecia que el cociente entre la síntesis del DNA del cromosoma y la del plasmidio a la temperatura permisiva (46) decae a 1,26 a la temperatura no permisiva. En este caso, hay disminución de la síntesis del DNA del cromosoma y del plasmidio, siendo considerablemente mayor la disminución de la correspondiente al

TABLA II

*Efecto de mutaciones en las funciones dnaA, B, G y E sobre la replicación de pP4*

	% cpm (42°C/30°C)		crm/pP4	
	crm	pP4	30°C	42°C
C2307 ( <i>dnaA</i> )	17	-	-	-
C2307 (pP4 <i>vir1</i> )	130	255	51	26
LD312 ( <i>dnaB</i> )	0	-	-	-
LD312 (pP4 <i>vir1</i> )	0,32	12	7,4	1,3
C2309 ( <i>dnaE</i> )	0,52	-	-	-
C2309 (pP4 <i>vir1</i> )	21	46	133	62
LD301 ( <i>dnaE</i> )	5,1	-	-	-
LD301 (pP4 <i>vir1</i> )	2,5	21	7,7	0,9

En esta tabla se resumen los datos obtenidos en las figuras 10 y 11. Los números de las dos columnas de la izquierda representan el porcentaje de la síntesis de DNA a la temperatura no permisiva (42°C) respecto de la permisiva (30°C), utilizando el número total de cuentas del cromosoma y del plasmidio. Los números de las dos columnas de la derecha son los cuocientes de las cuentas totales del cromosoma sobre el plasmidio incorporadas a la temperatura permisiva (30°C), y no permisiva (42°C).

cromosoma.

El comportamiento de la mutante *dnaG* a la temperatura permisiva se muestra en la figura 12a. El número de copias de pP4 es de 2,6. Al transferir los cultivos a 42°C (figura 12b) se observa que la síntesis de DNA de la cepa control cesa casi por completo. Sin embargo, cuando esta cepa lleva pP4, los niveles de síntesis permanecen relativamente altos. Como se ve en la Tabla II, el cociente de replicación cromosoma plasmidio baja de 133 a 62, pareciendo que la síntesis del cromosoma se ve un poco más afectada. Este experimento revistió especial interés, ya que el gen *dnaG* codifica para una DNA primasa y a su vez se ha postulado que la proteína  $\alpha$  de P4 es una DNA primasa. A pesar que es claro que pP4 no requiere de la DNA primasa celular para replicar su DNA, la proteína  $\alpha$  de P4 no es capaz de complementar totalmente con esta actividad, ya que la cepa que lleva el plasmidio no crece a temperaturas no permisivas, pero es capaz de complementar, por un tiempo, la actividad defectiva de la primasa.

Finalmente, se analizó la mutación *dnaE*, que afecta la DNA polimerasa III. En la figura 12c se muestra el comportamiento de esta cepa mutante que lleva el plasmidio a la temperatura permisiva. El número de copias obtenido a 30°C es alto (44) lo cual parece estar en contradicción con los resultados presentados para la cepa C1a(pP4vir1). La cantidad de cuentas totales del pico correspondiente al plasmidio no parecen estar aumentadas con respecto a los otros experimentos en que el número de copias fue bajo, pero hay pocas cuentas en el pico correspondiente al DNA cromosomal, lo cual indicaría que la velocidad

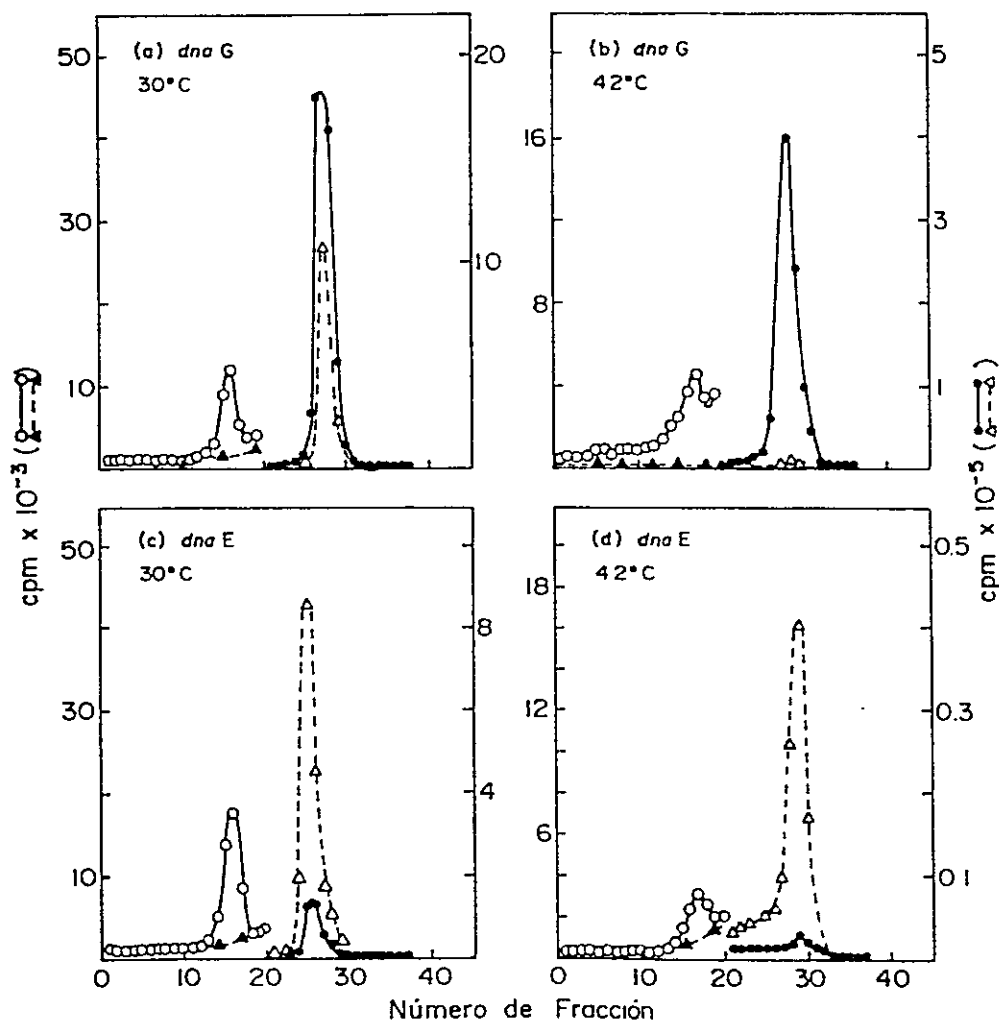


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la síntesis de pP4 en cepas termosensibles en las funciones *dnaG* y *E*. Los gradientes en CsCl-yoduro de propidio se realizaron como se describió en Materiales y Métodos. La línea continua representa la cepa que porta pP4, y la línea punteada la cepa sin plasmidio. a) C2309 y C2309(pP4*vir1*) (*dnaG ts*) crecidas a 30°C y marcadas con un pulso de [6-<sup>3</sup>H]-timidina durante 10 minutos. b) Como en (a) pero transferidas a 42°C durante 120 min previos a la marcación. c) LD301 y LD301(pP4*vir1*) (*dnaE ts*) crecidas a 30°C y marcadas como en (a). d) Como en (c) pero transferidas a 42°C durante 120 minutos previos a la marcación.

de síntesis del cromosoma disminuyó. Mediante geles de agarosa e hibridación en filtros de nitrocelulosa (no se muestra) también se obtiene un número de copias más alto que el esperado. Este resultado será discutido más adelante. Al transferir los cultivos a 42°C (figura 12d), esta situación se torna más dramática aún. El cociente de replicación del cromosoma con respecto al del plasmidio baja de 7,7 a 30°C, a 0,9 a 42°C (ver Tabla II), y en este caso la síntesis del DNA cromosomal está más desfavorecida que la síntesis del plasmidio. Tomando como antecedente la magnitud de la reducción de la replicación del DNA en la cepa que no lleva el plasmidio, se podría pensar que el plasmidio reduce su replicación en un rango similar, y que el cromosoma es más afectado, porque habría una competencia por el producto génico defectivo *dnaE*, en la cual pP4 se vería favorecido por su número (mayor que el del cromosoma), y por su velocidad de replicación. Se podría concluir entonces, que pP4 necesita de este producto génico para su replicación y compite por él.

La contradicción aparente que existe en el número de copias de esta cepa determinado a 30°C, puede explicarse mediante el modelo propuesto por Pritchard *et al.*, (1968), acerca del control de la replicación del DNA. Los autores postularon que el número de copias de un plasmidio estaría regulado por la frecuencia de la iniciación de la replicación, y que existe una relación entre masa celular y síntesis de DNA. Si se aumenta el tiempo de duplicación celular (en este caso mediante una mutación), y la frecuencia de iniciación permanece constante, se sintetizarán más copias de pP4 por célula.



Los resultados que se presentaron anteriormente, en los cuales hay incorporación de cuentas en el pico correspondiente al DNA cromosomal de los mutantes, no pueden ser explicados como incorporación en DNA de pP4 que se ha relajado, o que no se ha superenrollado, y que migra en la posición del cromosoma, ya que se hicieron los controles adecuados para descartar esta posibilidad. Se procedió a hibridar DNA correspondiente a los picos del cromosoma de todas las mutantes, con DNA radiactivo de P4, y los niveles de hibridación corresponden a la copia de P4 que está integrada en el cromosoma, no encontrándose el exceso de P4 que pudiese provenir del DNA relajado (no se muestra).

#### *FUNCIONES DE P4 QUE AFECTAN LA MANTENCION DEL PLASMIDIO*

Se investigó cuales de las funciones conocidas de P4 afectaban, o eran necesarias para la mantención del plasmidio. Una función que se determinó como esencial es la codificada por el gen  $\alpha$ , como ya se describió anteriormente. Por estudios previos en el fago P4, se sabía que el gen *psu* era importante en la regulación de los niveles de  $\alpha$  (Lee y Goldstein, 1985). En estos estudios se observó que la proteína  $\alpha$ , que es una proteína temprana, que se sintetiza inmediatamente después de la infección, alcanza un máximo en la velocidad de síntesis antes de los diez primeros minutos. Luego la síntesis de  $\alpha$  se detiene, reiniciándose nuevamente a los 45 min después de la infección, y se mantiene por al menos 6 horas después de la infección. La reiniciación de la síntesis de la proteína  $\alpha$  parece estar controlada por la proteína *psu*, ya que mutantes en esta proteína son incapaces de reiniciar la síntesis de la proteína  $\alpha$ , y ésta se mantiene en niveles basales relativamente bajos,

que son alrededor de un 20% de los alcanzados en la cepa silvestre (Lee y Goldstein, 1985). El gen *sid* también tiene un efecto sobre la síntesis de  $\alpha$ , probablemente un efecto pleiotrópico, ya que los niveles de síntesis de *psu* se ven notablemente disminuidos en una mutante *sid*, lo cual a su vez afecta la reiniciación de la síntesis de la proteína  $\alpha$  (Lee y Goldstein, 1985). Se pensó que estas mutantes que afectaban la síntesis de  $\alpha$ , que es la proteína de P4 esencial para la replicación de su DNA, podrían afectar la mantención del plasmidio, y específicamente su número de copias.

Se establecieron en la cepa C1a, plasmidios de las mutantes  $\delta 35$ , *psu1*, *psu2* y *sid1*, las cuales llevaban además la mutación *vir1*, del modo que está descrito en Materiales y Métodos. Ninguna de estas mutantes revistió especial dificultad en ser establecida como plasmidio. Se determinó que todas estas mutantes se propagan en número alto de copias (figura 13) al ser crecidas en medio LBG a 37°C con aireación. Este hallazgo es sorprendente, ya que para el caso de la mutante *psu* se esperaba algún efecto sobre la replicación del plasmidio. Por esta razón se estableció el plasmidio usando dos mutantes diferentes de *psu*: *psu1* (con una mutación ámbar) y *psu2* (la cual parece ser una mutación de punto) (Lee y Goldstein, 1985). En ambos casos (figura 13a y b) pP4*psu* se propaga en número alto de copias. Del mismo modo, la mutación *sid1* (que es una mutación ámbar) (figura 13d) no afectó el número de copias. La mutante  $\delta 35$ , que no produce el producto génico *sid*, tampoco influye en la propagación de pP4 (figura 13c).

Con el objetivo de clarificar la importancia de los niveles de la

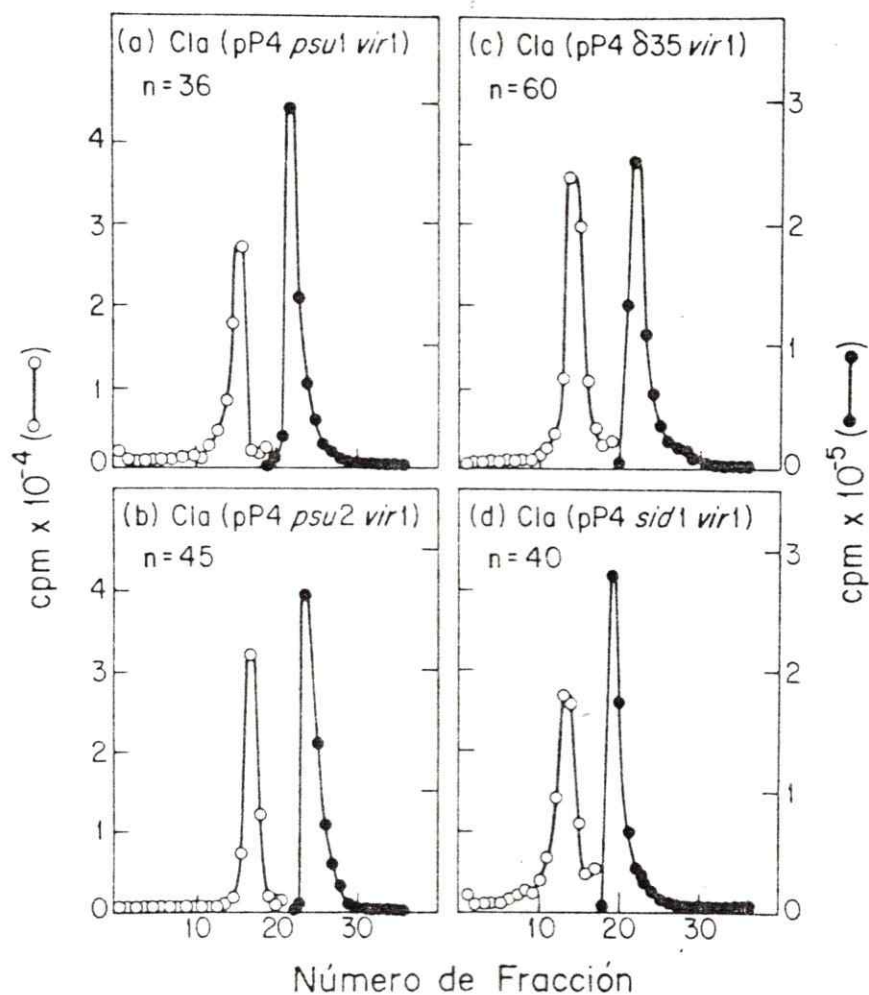


Figura 13. Número de copias de mutantes derivadas de pP4. Los gradientes en CsCl-yoduro de propidio se realizaron como se describió en la figura 2, usando las condiciones de crecimiento para número alto de copias (medio LBG con aireación a 37°C). a) Cla(pP4*psu1vir1*). 2) Cla(pP4*psu2vir1*). c) Cla(pP4 $\delta 35$ *vir1*). d) Cla(pP4*sid1vir1*).

proteína  $\alpha$  en el establecimiento y mantención del plasmidio, se extendieron los estudios usando la mutante *psu*. Se siguió la cinética del número de copias de P4 después de la infección, de modo de detectar algún efecto sobre el número de copias, que desapareciese una vez que el plasmidio se propagase en forma estable. En la figura 14 se muestra la cinética del número de copias después de infectar con P4. Se dió un pulso de [6-<sup>3</sup>H]-timidina después de 15 min de la infección (a), 45 min (b), 90 min (c), y 150 min (d), encontrándose un número de copias de 37, 46, 48 y 54 respectivamente. Para estos experimentos se usó la cepa huésped C3103, que fue usada para los experimentos de determinación de productos génicos. Estos experimentos fueron repetidos en la cepa C1a con resultados similares. Los resultados muestran que después de los 15 min de infección el número de copias permanece relativamente constante, en el rango de los encontrados para la cepa que porta el plasmidio en la forma estable, y aún cuando los niveles de la síntesis de la proteína  $\alpha$  son significativamente diferentes a los 15 min con respecto a 90 min después de la infección (aumentado 3-4 veces), esto no parece tener una influencia apreciable en el número de copias.

Por otro lado, se obtuvo un resultado muy similar después de infectar con la mutante *psu1*. En la figura 15 se muestra la cinética del número de copias después de 15 (a), 45 (b), 90 (c) y 150 min (d) de infectar con P4*psu1*, encontrándose que el número de copias es de 36, 47, 49 y 55 respectivamente. Estos resultados son básicamente iguales a los observados en el control de la figura 14, lo cual demuestra que aún cuando no hay reiniciación de la síntesis de la proteína  $\alpha$ , y el nivel

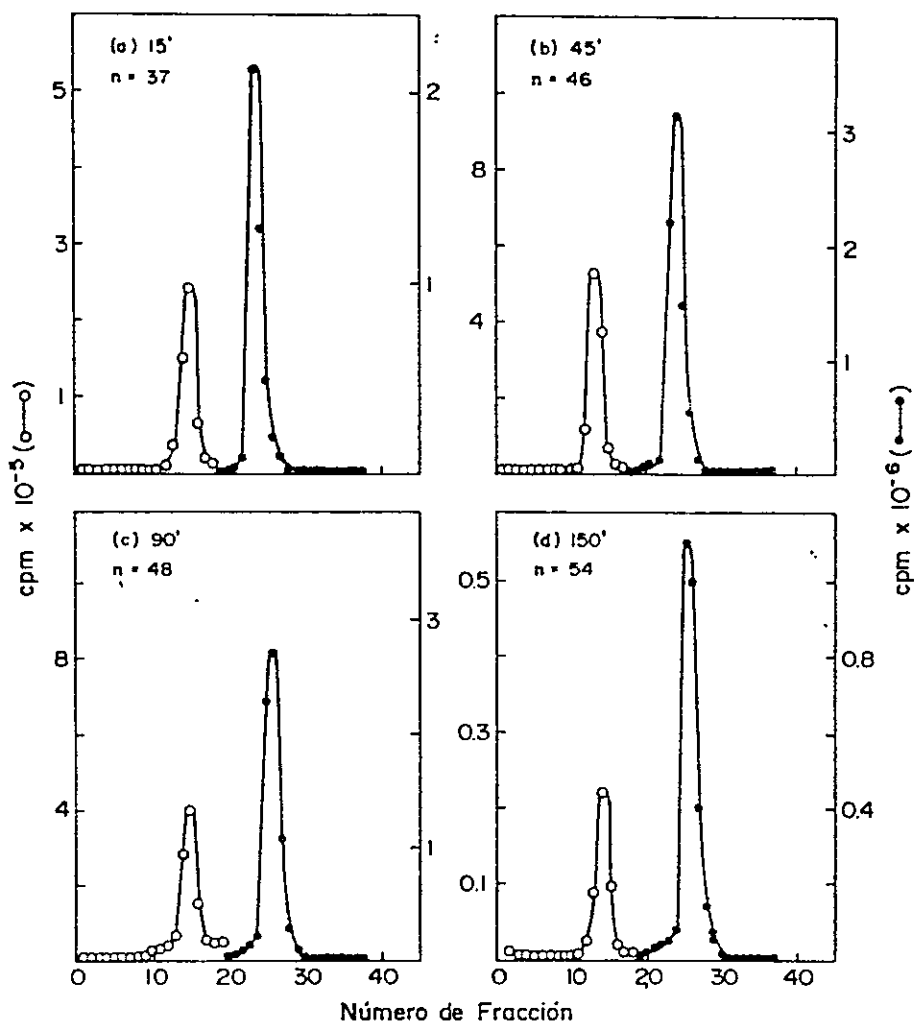


Figura 14. Cinética del número de copias de la forma superenrollada de P4vir1 después de la infección. Los gradientes en CsCl-yoduro de propidio se realizaron como se describió en Materiales y Métodos. Se utilizó la cepa C3103 como cepa huésped, y se infectó con P4vir1 a una multiplicidad de infección de 10. Después de la infección, el cultivo se incubó a 37°C con agitación, y a los tiempos indicados en la figura se dio un pulso de 10 minutos con [6-<sup>3</sup>H]-timidina.

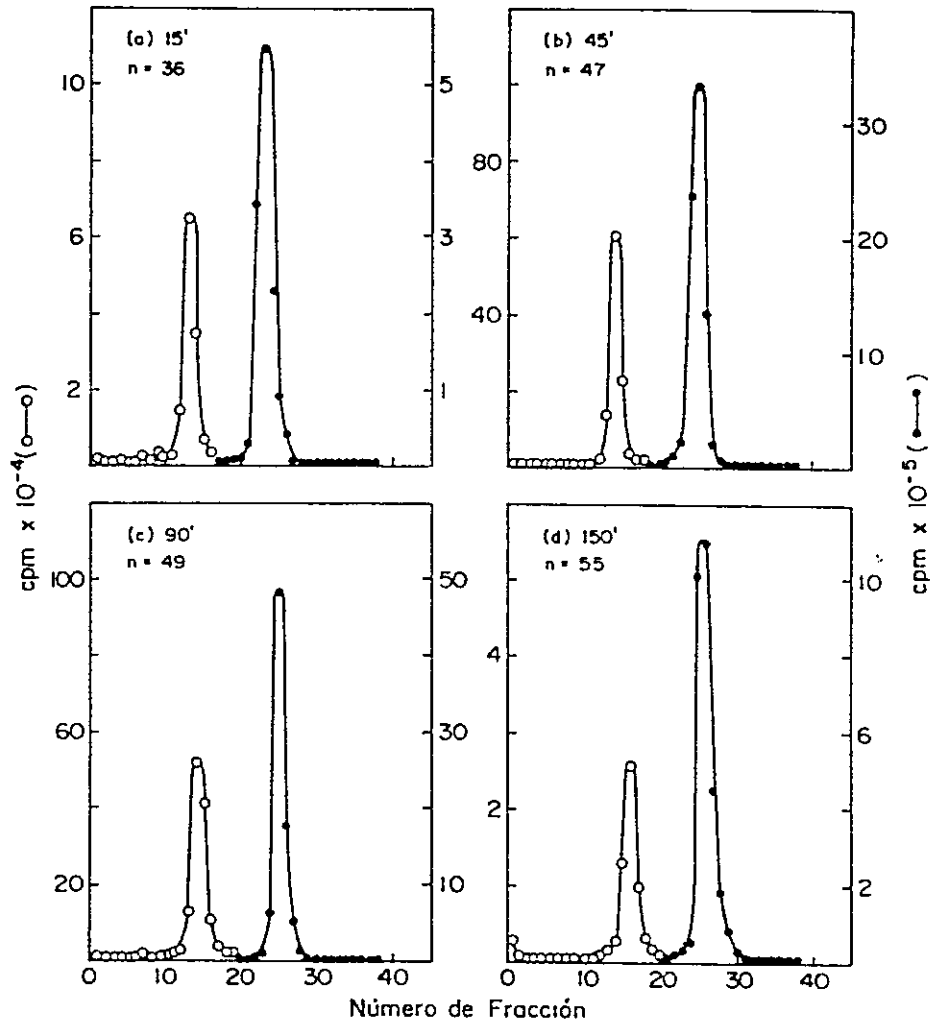


Figura 15. Cinética del número de copias de la forma superenrollada de P4psulvir1 después de la infección. Los gradientes, infección y marcación se realizaron como se describió en la figura 14, usándose la mutante P4psulvir1.

basal de síntesis se ha reducido 5 veces, esto no se refleja en una disminución de la síntesis del DNA de pP4. Esto implicaría que la proteína  $\alpha$  no es limitante, y a pesar que sus niveles de síntesis están reducidos 5 veces, la cantidad de proteína  $\alpha$  es suficiente para mantener un número alto de copias de pP4.

En los experimentos descritos anteriormente se analizaron por separado los efectos de las mutaciones *psu* y *sid*, que son genes que controlan la expresión de  $\alpha$ . Con el objeto de estudiar si dobles mutantes en estos genes afectaban la mantención del plasmidio, se usaron dos mutantes construidas *in vitro*. Estas mutantes fueron construidas invirtiendo el fragmento B de *Hind*III ( $\delta inv9$ ), y el fragmento B de *Bam*HI ( $\delta inv11$ ) (ver figura 16), en las cuales se ha interrumpido el circuito genico *psu*- $\delta$ -*sid*. Estas mutantes son fenotípicamente  $\delta^-$ , *psu*<sup>-</sup>, y genotípicamente no producen los productos génicos *psu* y *sid* (Jiang y Goldstein, en preparación). Plasmidios con estas mutaciones se establecieron con facilidad en la cepa C1a. En la figura 17a y 17b se muestra que ambos pueden propagarse en número alto de copias, de 45 y 43 para  $\delta inv9$  y  $\delta inv11$  respectivamente. En esta misma figura (figura 17c) se muestra que la mutante  $\Delta 10$  puede ser establecida y propagarse en número alto de copias (n=27). Esta mutante tiene una delección de la parte no esencial del genoma de P4, y en esta región se codifica para la proteína 2 de P4, la cual es una proteína temprana de función desconocida (Kahn *et al.*, 1980). Esta proteína parece no tener ninguna importancia en la replicación y mantención de pP4.

Se analizó también el efecto de las funciones  $\epsilon$  (relacionada con la



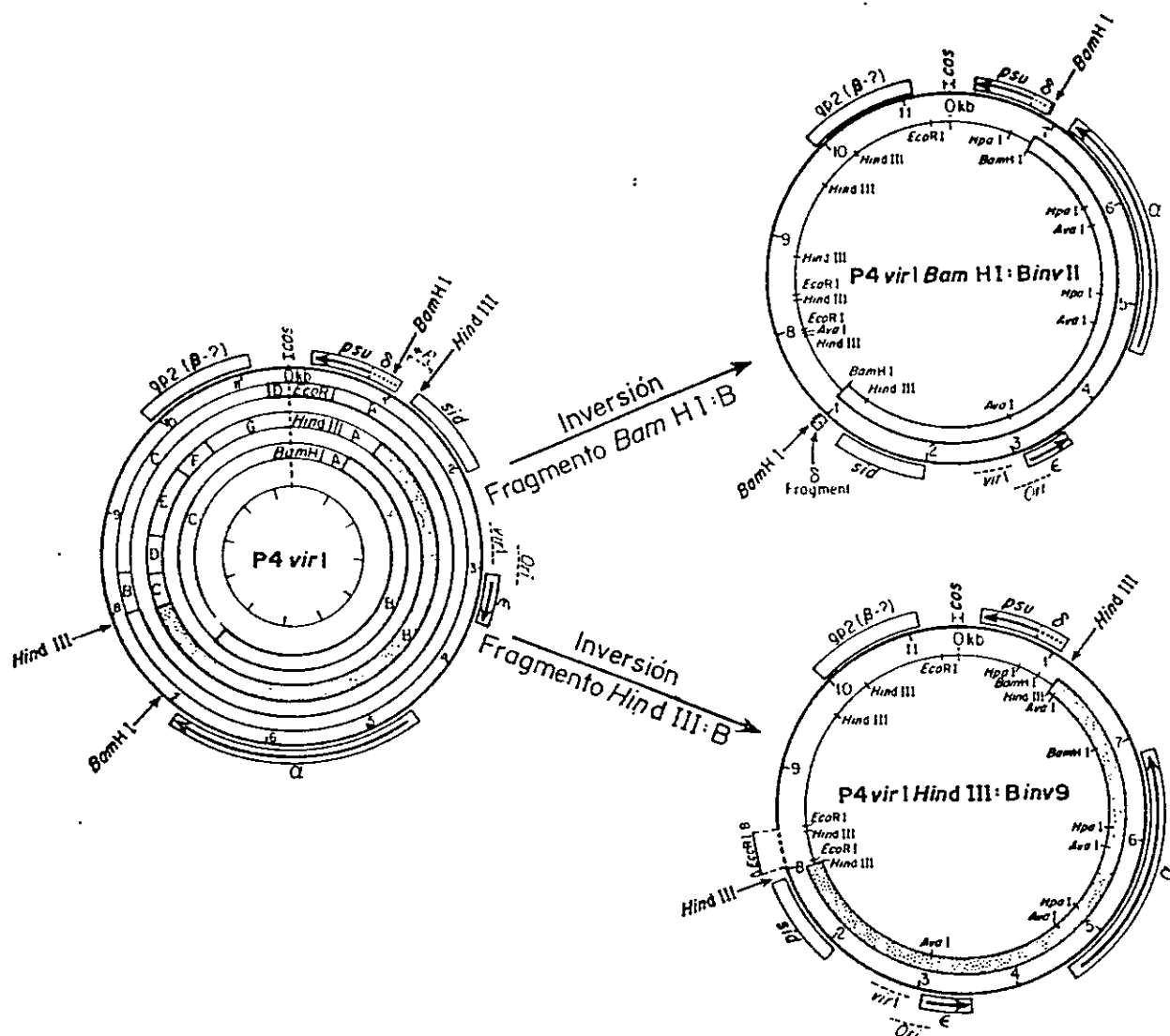


Figura 16. Mutantes  $P4\delta inv9vir1$  y  $P4\delta inv11vir1$  construidas *in vitro* en las cuales se ha rearmado el circuito genico  $psu-8-sid$ . Los mapas de restricci3n  $EcoRI$ ,  $HindIII$  y  $BamHI$  del fago  $P4vir1$  se muestran al lado izquierdo de la figura. N3tese que los fragmentos  $HindIII:B$  y  $BamHI:B$  est3n contenidos dentro del fragmento  $EcoRI:AD$ . Para un mayor 3nfasis, estos fragmentos se muestran achurados u oscurecidos. Los fagos resultantes de las inversiones de los fragmentos  $HindIII:B$  y  $BamHI:B$  se muestran a la derecha de la figura. Las abreviaturas est3n explicadas en la leyenda de la figura 24 y en el texto (tomado de Jiang y Goldstein, en preparaci3n).

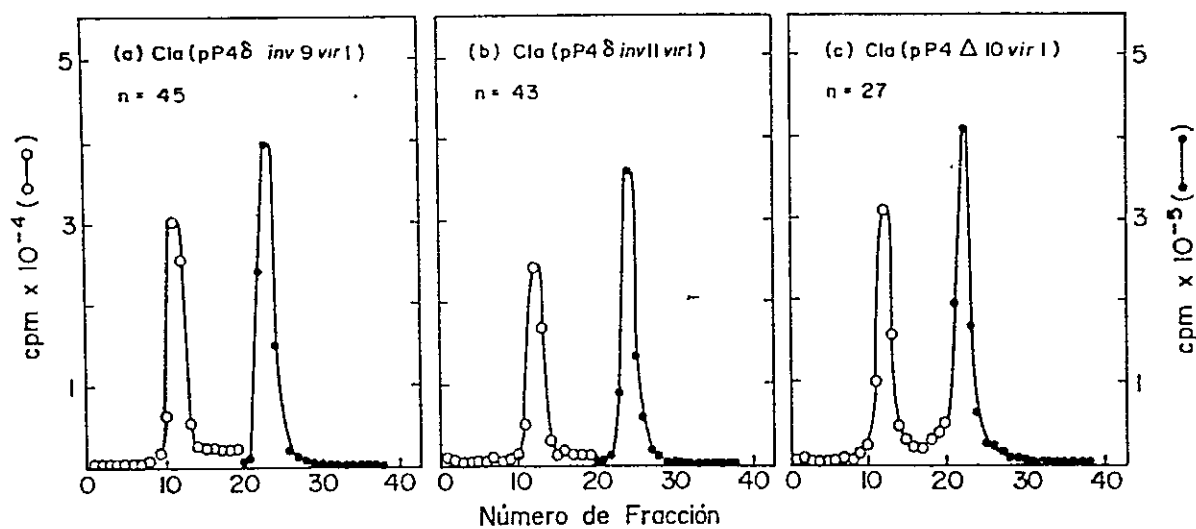


Figura 17. Determinación del número de copias de mutantes derivadas de *pP4*. Los gradientes se realizaron como se describió en la leyenda de la figura 2, usando las condiciones de crecimiento para número alto de copias (medio LBG con aireación a 37°C). a) *Cla(pP4 $\delta$ inv9vir1)*. b) *Cla(pP4 $\delta$ inv11vir1)*. c) *Cla(pP4 $\Delta$ 10vir1)*.

desrepresión del fago P2 (Geisselsoder et al., 1981), e *int* (integración de P4 en el cromosoma bacteriano, Calendar et al., 1981), sobre la mantención de pP4. Con este objeto se utilizaron las mutantes  $\epsilon_{\Delta 104}$  (mutación ámbar), y  $\Delta 2$ , que fue aislada como una deleción espontánea en la que perdió el gen *int* (Kahn et al., 1980; Calendar et al., 1981). Ninguna de las dos puede mantenerse como plasmidio. Después de infectar células con la mutante  $\epsilon_{\Delta 104}$  no se pudo aislar clones con pP4. Experimentos que se describirán más adelante, descartaron un efecto inmediato sobre la replicación de P4. La mutante  $\Delta 2$  en cambio, puede ser mantenida en el estado de plasmidio por algunas generaciones, pero los clones que llevan pP4 invariablemente terminan segregando el plasmidio, lo cual sugiere que el efecto es a nivel de la estabilidad de pP4. También este caso se analizará en mayor detalle más adelante.

*La variación del número de copias por las condiciones de crecimiento está bajo el control genético de pP4.* Hasta el momento, el análisis de las mutantes se hizo en cuanto a la capacidad de ser mantenidas como un plasmidio estable, y en cuanto al número de copias. Se analizó si estas mutantes variaban su número de copias como respuesta a las condiciones de crecimiento. Resulta muy laborioso realizar este análisis mediante la técnica de centrifugación al equilibrio en CsCl-yoduro de propidio, por lo que se recurrió a un método semicuantitativo capaz de discernir entre número alto o bajo de copias. El DNA se preparó por el método de extracción alcalina con SDS que está descrito en Materiales y Métodos, se sometió a electroforesis en agarosa y tinción del DNA con bromuro de etidio. Se corrieron muestras cuyos números de copias se conocían por el

método de gradientes, de modo de comprobar que el método distinguía inequívocamente entre número alto y bajo de copias (figura 18). Fue posible distinguir entre cepas que no llevan el plasmidio (C1a, C1a(P4wt) y C1a(pP4vir1αts61) crecida a 42°C) (posiciones 1, 2 y 9); cepas que lo llevan en número bajo (C1a(pP4vir1) crecida a 30°C y C1a(pP4vir1αts61) crecida a 37°C) (posiciones 4 y 8); y en número alto (C1a(pP4vir1), C1a(pP4vir1psul), C1a(pP4vir1sid1), C1a(pP4vir1δ35) crecidas en LBG con aireación a 37°C) (posiciones 2, 5, 6 y 7).

De este modo se analizaron todas las mutantes en cuanto a su capacidad de responder a la ausencia de glucosa y a la temperatura de 30°C. Como se observa en la figura 19, todas las mutantes a excepción de  $\delta inv9$  responden a las condiciones de crecimiento, es decir, presentan un número bajo de copias en ausencia de glucosa, o cuando son crecidas a 30°C. El número de copias de la mutante  $\delta inv9$ , en cambio, permanece invariable (siempre alto) con las condiciones de crecimiento.

En la figura 20 se muestra la determinación del número de copias de la mutante  $\delta inv9$  a través de gradientes al equilibrio en CsCl-yoduro de propidio, crecida bajo diferentes condiciones. En ella se observa que el número de copias del plasmidio fluctúa entre 15 y 66. En este caso, la mutación debida a la inversión del fragmento B de *HindIII*, o la mutación causada por la delección del fragmento B de *EcoRI*, o ambas, serían responsables del efecto sobre el control del número de copias, en respuesta a condiciones que parecen tan diferentes como son la temperatura y la glucosa. El efecto de esta última, no se pierde por la adición de cAMP 10 mM como en el caso del tipo silvestre (ver figura

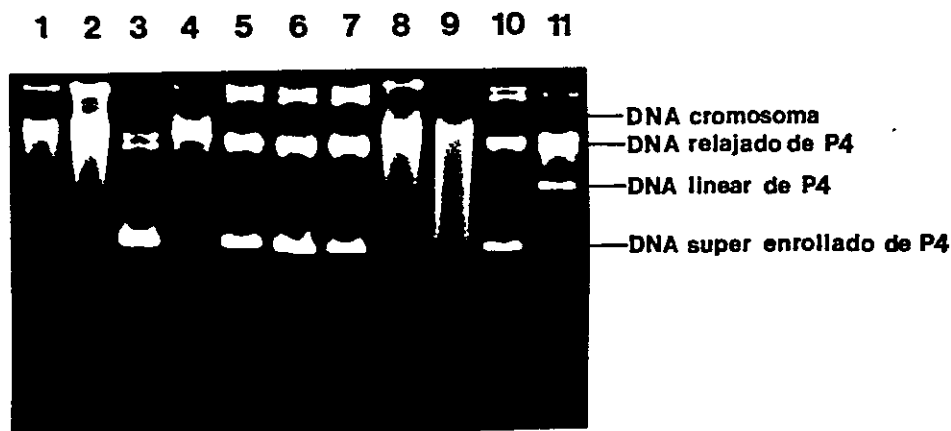


Figura 18. *Determinación semicuantitativa del número de copias de pP4, mediante electroforesis en geles de agarosa.* Los geles se prepararon, corrieron y tñieron como se describió en Materiales y Métodos. La concentración de agarosa fue de 0,7%. El DNA se extrajo por el método de extracción rápida (ver Materiales y Métodos). Las células se crecieron en medio LBG a 37°C con oxigenación, a menos que se especifique un cambio en estas condiciones. 1) C1a; 2) C1a(P4wt); 3) C1a(pP4vir1); 4) C1a(pP4vir1) crecida a 30°C; 5) C1a(pP4psulvir1); 6) C1a(pP4δ35vir1); 7) C1a(pP4sidivir1); 8) C1a(pP4xts61vir1) crecida a 37°C; 9) C1a(pP4xts61vir1) crecida a 42°C; 10) pP4vir1 purificado a través de gradientes; 11) DNA del fago P4vir1.

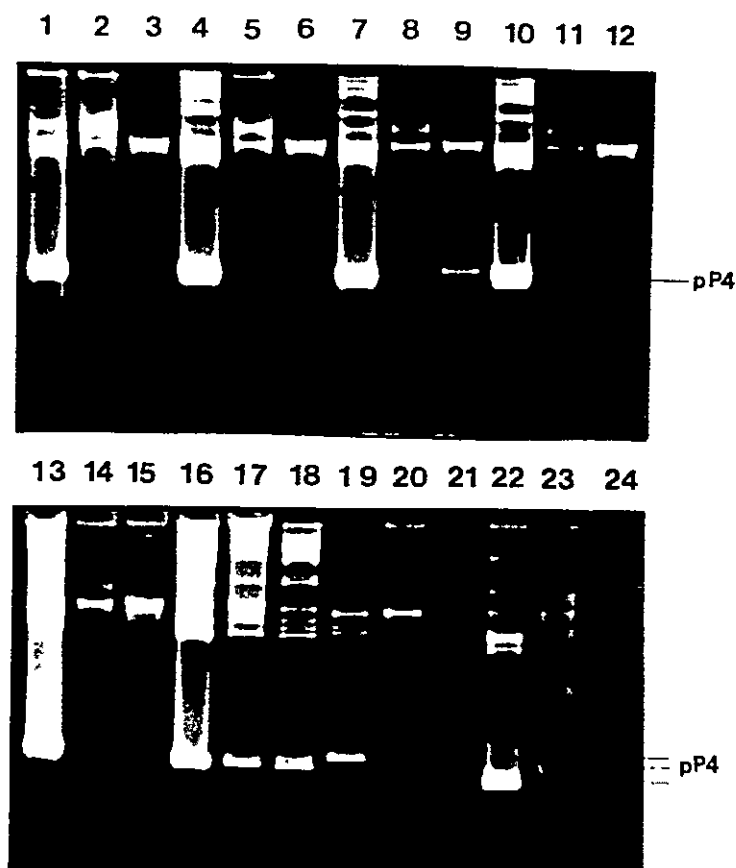


Figura 19. Determinación semicuantitativa del número de copias de mutantes derivadas de pP4 crecidas bajo diferentes condiciones mediante electroforesis en agarosa. La preparación y electroforesis en agarosa del DNA se hizo como se describió en la figura 18. Las células se crecieron en medio LBG, a menos que se especifique un cambio en estas condiciones. Cl<sub>a</sub>(pP4*vir1*) crecida sin cambios (1), a 30°C (2) y sin glucosa (3); Cl<sub>a</sub>(pP4*psulvir1*) crecida sin cambios (4), a 30°C (5) y sin glucosa (6); Cl<sub>a</sub>(pP4*psu2vir1*) crecida sin cambios (7), a 30°C (8) y sin glucosa (9); Cl<sub>a</sub>(pP4 $\delta$ 35*vir1*) crecida sin cambios (10), a 30°C (11) y sin glucosa (12); Cl<sub>a</sub>(pP4*sid1vir1*) crecida sin cambios (13), a 30°C (14) y sin glucosa (15); Cl<sub>a</sub>(pP4 $\delta$ inv9*vir1*) crecida sin cambios (16), a 30°C (17) y sin glucosa (18); Cl<sub>a</sub>(pP4 $\delta$ inv11*vir1*) crecida sin cambios (19), a 30°C (20) y sin glucosa (21); Cl<sub>a</sub>(pP4 $\Delta$ 10*vir1*) crecida sin cambios (22), a 30°C (23) y sin glucosa (24).

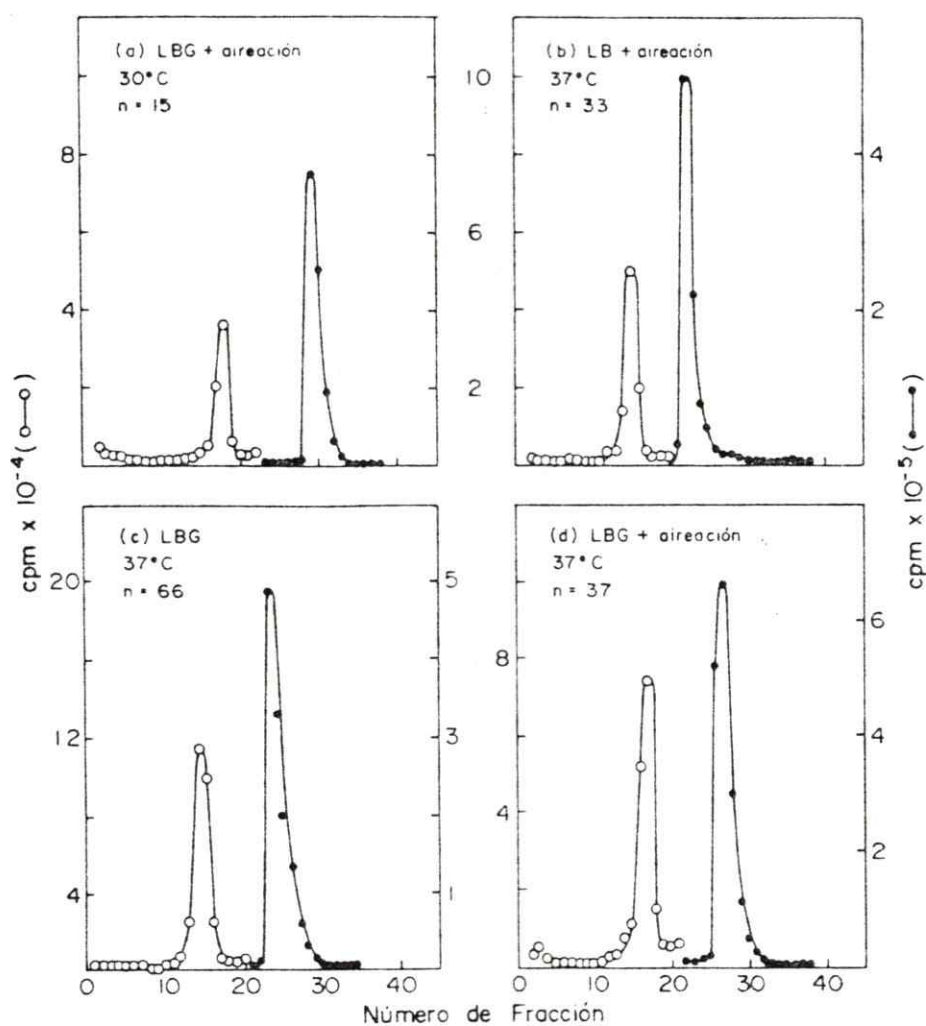


Figura 20. Cl1a(pF48inv9vir1) crecida bajo diferentes condiciones. Los gradientes en CsCl-yoduro de propidio se realizaron como se describió en la figura 2. Las condiciones usadas para crecer Cl1a(pF48inv9vir1) fueron: a) LBG con aireación a 30°C; b) LB con aireación a 37°C; c) LBG sin aireación a 37°C y d) LBG con aireación a 37°C.



21), ya que el número de copias permanece alto ( $n=24$ ).

Se analizó si todas las mutantes de pP4 que eran mantenidas en forma estable, tenían una copia integrada en el cromosoma. Para esto se usó la técnica de hibridación del DNA digerido con la enzima *EcoRI* y transferencia a filtros de nitrocelulosa. En la figura 22 se muestra que las mutantes *psu1*,  $\delta 35$  y *sid1* se han integrado en el cromosoma bacteriano (dado por la presencia de los fragmentos X1 y X2 que son tenues ya que no hubo sobreexposición de la autoradiografía), y puesto que las células fueron crecidas en condiciones de número de copias alto la banda de mayor intensidad corresponde al fragmento AD (proveniente del plasmidio libre). En la figura 23 se observa un resultado similar para las mutantes  $\delta inv9$ ,  $\delta inv11$  y  $\Delta 10$ . Se aprecia que el patrón de digestión con la enzima *EcoRI* de la mutante  $\delta inv11$  es idéntico al del tipo silvestre, ya que la inversión del fragmento *BamHI* no compromete el sitio *att* (para mayor detalle ver la figura 24 en la que se presenta el mapa genético y de restricción de P4). Sin embargo, la mutante  $\Delta 10$  difiere del tipo silvestre en el fragmento C, en el cual se encuentra la delección, por lo que en lugar del fragmento C se resuelve uno de menor tamaño. En la mutante  $\delta inv9$  se encuentra un fragmento de migración mayor que el fragmento X1. Este corresponde a uno de los fragmentos que llevan el sitio *att*, el cual, producto de la inversión del fragmento B de *HindIII*, queda localizado en otro lugar. Este resultado indica que el sitio *att* está contiguo a la derecha del corte con *HindIII*. La integración de esta mutante en el cromosoma bacteriano no tiene fácil explicación, ya que carece del fragmento B, en el cual se ha localizado el gen *int* necesario

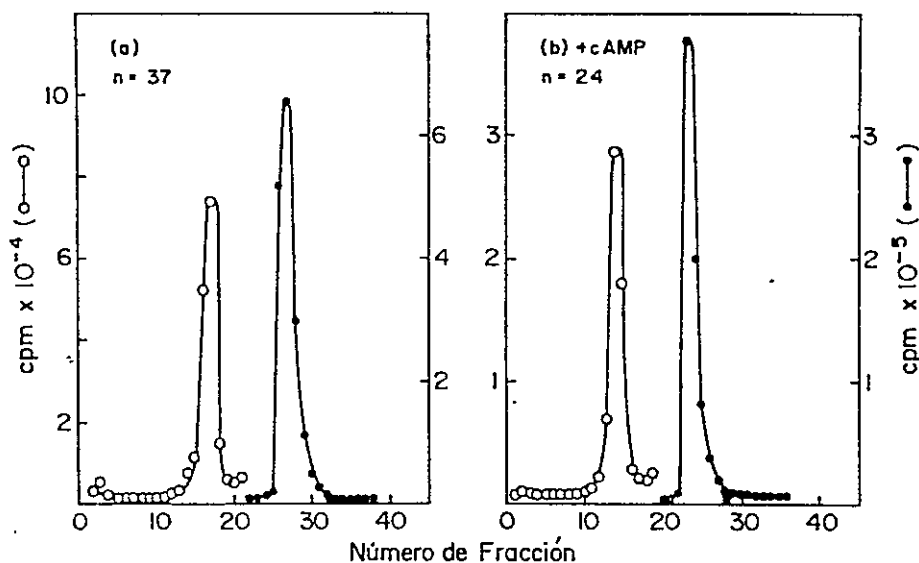


Figura 21. Efecto de *cAMP* sobre el número de copias de *Cia(pP4 $\delta$ inv9vir1)*. Los gradientes en *CsCl*-yoduro de propidio se realizaron como se describió en la leyenda de la figura 2. La cepa *Cia(pP4 $\delta$ inv9vir1)* fue crecida en medio LBG a 37°C con abundante oxigenación (a), y adicionándosele *cAMP* a una concentración final de 10 mM (b).

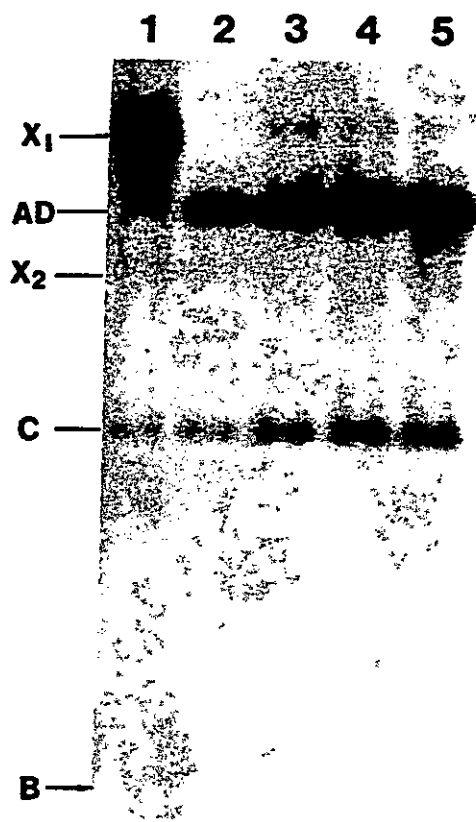


Figura 22. Hibridación del DNA total de mutantes derivadas de pP4 digerido con EcoRI por el método de Southern. La transferencia a nitrocelulosa e hibridación del DNA se llevó a cabo como se describió en la leyenda de la figura 7. Las células se crecieron en LBG con abundante oxigenación a 37°C. 1) Cl<sub>a</sub>(P4wt). 2) pP4vir1 purificado a través de gradientes. 3) Cl<sub>a</sub>(pP4psulvir1). 4) Cl<sub>a</sub>(pP4δ35vir1). 5) Cl<sub>a</sub>(pP4sid1vir1).

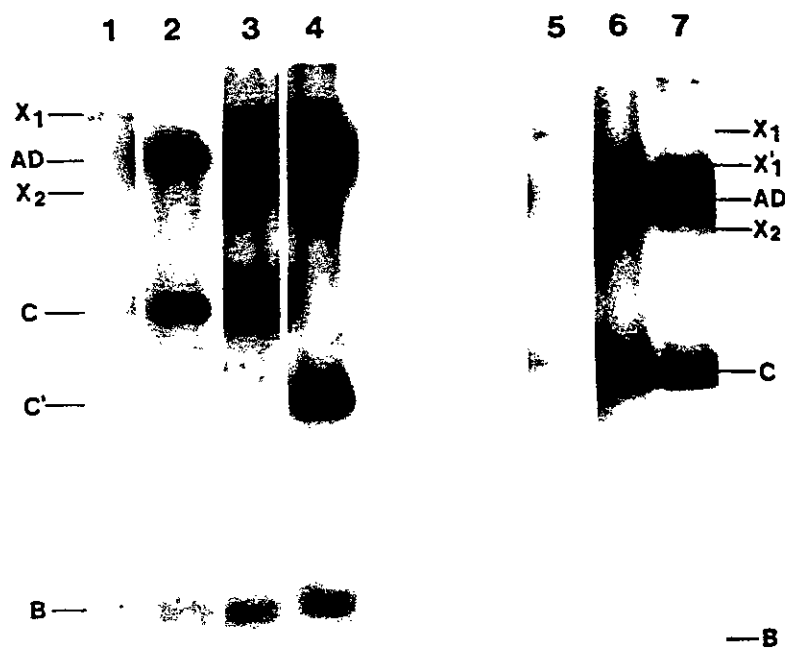


Figura 23. Hibridación del DNA total de mutantes derivadas de pP4 digerido con EcoRI por el método de Southern. La transferencia a nitrocelulosa e hibridación del DNA se llevó a cabo como se describió en la leyenda de la figura 7. Las células se crecieron en LBG con abundante oxigenación a 37°C. 1) Cl<sub>a</sub>(P4wt). 2) pP4vir1 purificado a través de gradientes. 3) Cl<sub>a</sub>(pP4 $\delta$ inv11vir1). 4) Cl<sub>a</sub>(pP4 $\Delta$ 10vir1). 5) Cl<sub>a</sub>(P4wt). 6) pP4vir1 purificado a través de gradientes. 7) Cl<sub>a</sub>(pP4 $\delta$ inv9vir1). X1' representa el fragmento de union X1 que se ha modificado debido a la inversión del fragmento B $\Rightarrow$ HI:B.

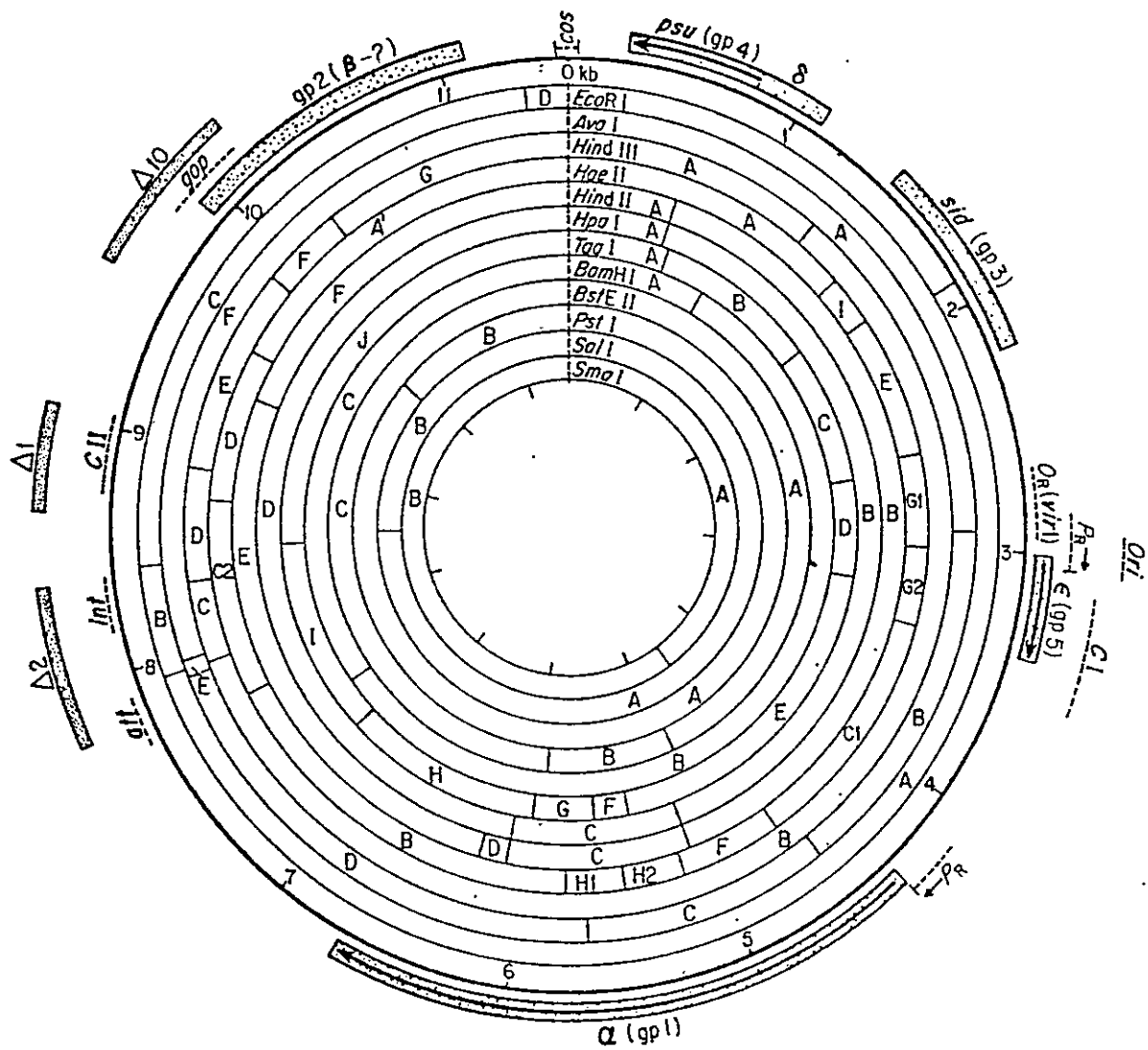


Figura 24

Figura 24. Mapa genético y de restricción del plasmidio P4. La localización del promotor para la transcripción hacia la derecha ( $P_R$ ) del gen  $\epsilon$  y el promotor para la transcripción hacia la derecha del gen  $\alpha$  están basados en los resultados de R.Z.Jiang y R. Goldstein (manuscrito en preparación). El genoma de 11,5 kb de P4 está dividido en incrementos de un kilobase partiendo desde el extremo cohesivo izquierdo denotado *cos*. Dos quintos del genoma no esencial para el desarrollo lítico de P4 en presencia de P2 se encuentra en la región inmediatamente después del carboxilo terminal del gen  $\alpha$ , hasta el sitio *att* (sin incluirlo). Los fragmentos de DNA resultantes de alguna digestión en particular están denotados A, B, C, etc. El fragmento A de una digestión en particular es aquel que ocurre inmediatamente a la derecha del sitio *cos*, desde la izquierda del extremo cohesivo hacia la derecha. Excepto para los mapas de restricción *Ava*I y *Taq*I todos los otros mapas de restricción han sido publicados previamente (Goldstein *et al.*, 1975; Kahn y Helinski, 1978; Kahn y Hopkins, 1978; Kahn *et al.*, 1980; Souza *et al.*, 1978). El mapa de *Ava*I fue obtenido de R.Z. Jiang y R. Goldstein (manuscrito en preparación), y el mapa incompleto de *Taq*I de Lin y Six (comunicación personal). Se escogió presentar el mapa de P4 en la forma circular, aún cuando todas las representaciones anteriores han sido en la forma lineal. El DNA intracelular de P4 es una molécula circular covalentemente cerrada, la cual es linearizada por un corte en los extremos cohesivos durante la reacción de empacamiento. Después de la inyección del DNA de P4 dentro de la célula, los extremos cohesivos complementarios se unen, dando lugar a la molécula circular covalentemente cerrada, que es la que se encuentra en el estado de plasmidio. Las abreviaturas usadas fueron: *ori*, origen de la replicación;  $O_R$ , Operador de la derecha; *gop* está relacionado con la capacidad de P4 de crecer en un huésped no permisivo para P4wt;  $\beta$ , un gen que parece ser no esencial para P4, cuyos mutantes termosensibles causan muerte celular. Todos los otros productos génicos, genes y sitios se describieron en Materiales y Métodos.

para la integración bacteriana (ver figura 24). Más aún, no fue posible mantener un plasmidio estable con una deleción producida *in vitro* del fragmento B de *EcoRI*.

En la Tabla III se muestra un resumen de las mutantes de P4 que son mantenidas como un plasmidio estable, y cual es el efecto de algunas mutaciones sobre el establecimiento y mantención de este plasmidio. A continuación se describirán los experimentos diseñados para comprobar que la integración de una copia de P4 en el cromosoma bacteriano es necesaria para la mantención de un plasmidio estable, no así para su replicación.

*La integración de P4 en el cromosoma bacteriano es necesaria para la propagación estable de pP4.* Para abordar el problema de estabilidad *versus* integración se usó la siguiente estrategia: el DNA de pP4 se cortó total o parcialmente con la enzima *EcoRI* de modo de obtener los fragmentos AD, ADC y ADBC (ver figura 24). Estos fragmentos fueron ligados a un gen kanamicina obtenido del plasmidio pUC4K (Viera y Messing, 1983), que tiene un tamaño aproximado de 1,2 kb. Este fragmento proviene del transposón tn901 (Oka et al., 1981), y sólo contiene la información que codifica para el gen que confiere resistencia a kanamicina. Se transformó la cepa C1a y la cepa MC1061 con este DNA, y se seleccionó para resistencia a kanamicina. Se aislaron cuatro clases de plasmidios, dos de los cuales presentan idéntica migración electroforética (ver figura 25). Si las células eran crecidas sin presión selectiva (es decir en ausencia de kanamicina), éstas

TABLA III

*Efecto de mutaciones de P4 sobre la estabilidad y número de copias de pP4 y sus derivados*

Mutación	Estabilidad	Número copias	Control número copias	Copia integrada
<i>vir1</i>	+	alto	+	+
<i>vir1psu1</i>	+	alto	+	+
<i>vir1psu2</i>	+	alto	+	+
<i>vir1δ35</i>	+	alto	+	+
<i>vir1δinv9</i>	+	alto	-	+
<i>vir1δinv11</i>	+	alto	+	+
<i>vir1sid1</i>	+	alto	+	+
<i>vir1εam104</i>	-			-
<i>vir1αts61</i> (30°C)	+	bajo		+
<i>vir1αts61</i> (42°C)	-			+
<i>vir1Δ2</i>	-			-
<i>vir1Δ10</i>	+	alto	+	+

Se usó C1a como cepa huésped. La determinación del número de copias se hizo como se describió en Materiales y Métodos, y se usaron las condiciones de crecimiento de alto número de copias. La determinación del número de copias de C1a(pP4*vir1*) se realizó 24 veces, siendo el promedio  $36 \pm 10$ . El profago integrado se determinó como se describió en Materiales y Métodos. Se considera que C1a(pP4αts61*vir1*) no mantiene el plasmidio a 42°C, pero si una copia integrada.



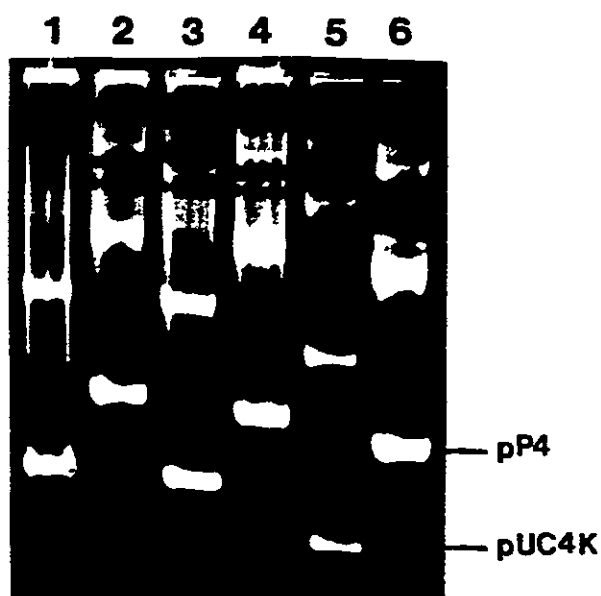


Figura 25. *Análisis de los clones que portan fragmentos EcoRI de pP4 y kanamicina.* La preparación y electroforesis del DNA se realizó como se describió en la figura 18. Los clones analizados corresponden a células transformadas con DNA de P4 digerido con *EcoRI*, y ligado al DNA de pUC4K digerido del mismo modo. La selección se hizo para resistencia a kanamicina y sensibilidad a ampicilina. Por análisis de la migración relativa de la forma superenrollada de estos plasmidios se estableció que fragmentos *EcoRI* de P4 portaban. (1) pP4vir1 *EcoRI*:AD-Km(1); (2) pP4vir1 *EcoRI*:ADBC-Km; (3) pP4vir1 *EcoRI*:AD-Km(2); (4) pP4vir1 *EcoRI*:ADC-Km; (5) pUC4K; (6) pP4vir1.

segregaban el plasmidio, con la consiguiente pérdida de resistencia al antibiótico. Se obtuvieron idénticos resultados usando las cepas huésped C1a y MC1061, por lo cual para mantener consistencia con los experimentos anteriores se continuó con la cepa C1a. Un análisis de estos plasmidios usando las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, indicó el lugar y la orientación del fragmento kanamicina (ver figura 26). Se obtuvo el fragmento AD ligado al de kanamicina con sus dos posibles orientaciones (la forma superenrollada de estos dos plasmidios presenta idéntica movilidad electroforética) y los fragmentos ADBC y ADC ligado a kanamicina (ver Figura 24). En este último, el fragmento kanamicina se insertó entre el fragmento C y el extremo D del fragmento AD, y la orientación del fragmento kanamicina procede desde el fragmento C hacia el extremo D del fragmento AD. La información acerca del tamaño esperado de los fragmentos producidos por los cortes con estas enzimas, está indicada en la leyenda de la figura 26. Como se observa, tres de estos plasmidios carecen del fragmento B que es donde se localiza el gen *int*, y no se pueden mantener en forma estable, aún cuando su replicación en presencia del agente selectivo es en número alto de copias (ver figura 25). Para demostrar que la estabilidad del plasmidio es conferida por la integración en el cromosoma bacteriano, se realizaron los experimentos que se describirán a continuación:

Fue necesario demostrar que estos plasmidios híbridos que carecen del fragmento B, y por lo tanto de la función *int*, no se integran en el cromosoma bacteriano. Para esto, el DNA total de células que llevan estos plasmidios crecidas en presencia de kanamicina 50 µg/ml, se

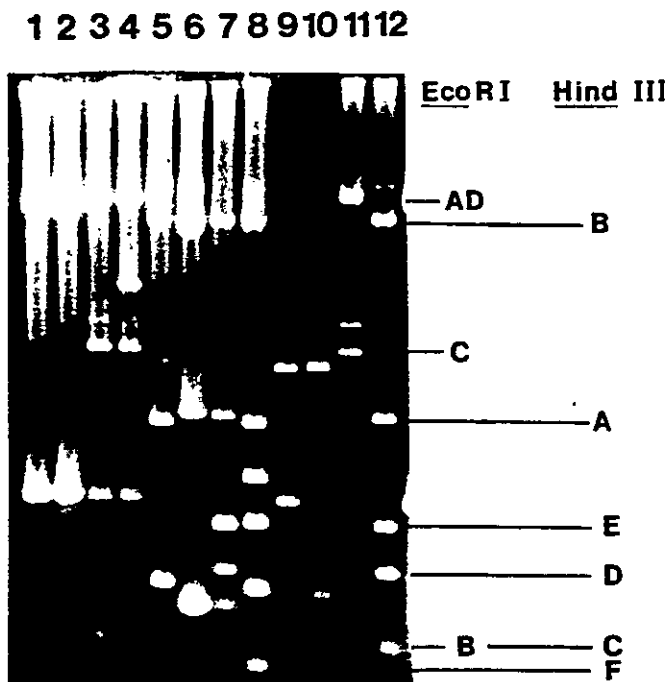


Figura 26. Determinación de la orientación y posición del fragmento kanamicina de los derivados de pP4vir1-Km mediante digestión con la enzima *Hind*III. Se analizaron los clones que se presentan en la figura 25 mediante electroforesis en agarosa del DNA digerido con *Eco*RI o *Hind*III. (1) pP4vir1 *Eco*RI:AD-Km(1)/*Eco*RI; (2) pP4vir1 *Eco*RI:AD(2)/*Eco*RI; (3) pP4vir1 *Eco*RI:ADBC-Km/*Eco*RI; (4) pP4vir1 *Eco*RI:ADC-Km/*Eco*RI; (5) pP4vir1 *Eco*RI:AD-Km(1)/*Hind*III; (6) pP4vir1 *Eco*RI:AD-Km(2)/*Hind*III; (7) pP4vir1 *Eco*RI:ADBC-Km/*Hind*III; (8) pP4vir1 *Eco*RI:ADC-Km/*Hind*III; (9) pUC4K/*Eco*RI; (10) pUC4K/*Hind*III-*Eco*RI; (11) pP4vir1/*Eco*RI; (12) pP4vir1/*Hind*III. Para pP4 y pUC4K se obtuvieron los fragmentos de *Eco*RI esperados. La digestión con *Hind*III corta en dos el fragmento pUC4K *Eco*RI:Km (1,2 kb): 650 y 550 pb (pares de bases) respectivamente, siendo la transcripción de izquierda a derecha. Los tamaños de los fragmentos *Eco*RI de P4 son: AD, 8250 pb; B, 450 pb; C, 2800 pb. Los tamaños de los fragmentos *Hind*III de P4 son: A, 2050 pb; B, 6700 pb; C, 450 pb; D, 760 pb; E, 1100 pb; F, 300 pb. Por análisis de todas las combinaciones posibles de la inserción del fragmento Km y la orientación de este último se determinó que: pP4vir1 *Eco*RI:AD-Km(1) presenta el fragmento Km orientado de A hacia D; pP4vir1 *Eco*RI:AD-Km(2) presenta el fragmento Km orientado de D hacia A; pP4vir1 *Eco*RI:ADC-Km presenta el ordenamiento ADC-Km y Km está orientado de C hacia D; pP4vir1 *Eco*RI:ADBC-Km presenta el ordenamiento ADCB-Km y kanamicina está orientado de B hacia A.

sometió a digestión con la enzima *EcoRI*, y luego de una electroforesis en agarosa al 0,7%, se transfirió a un filtro de nitrocelulosa para su hibridación con DNA del fago P4 marcado con  $^{32}P$ . El resultado de esta autoradiografía se muestra en el cuadro izquierdo de la figura 27. Como control se usó un plasmidio de P4*sid1* el cual lleva el gen de resistencia a kanamicina proveniente del transposón *tn5* insertado en el gen *psu*, y por lo tanto tiene la función *int* intacta. Este plasmidio se mantiene en ausencia de presión selectiva, y el número de copias responde a las condiciones de crecimiento de las células. En esta figura se aprecia que pP4*sid1*-Km presenta la banda correspondiente a X1 con una movilidad electroforética menor, debido a que ahora posee el transposón con el gen kanamicina (esta inserción no tiene sitios para la enzima *EcoRI*). Esto indica que la inserción de un fragmento foráneo de DNA, no afecta la integración en el cromosoma bacteriano si los genes necesarios para ella están presentes. Sin embargo, como se muestra en esta misma figura, los plasmidios que carecían del fragmento B no pudieron integrarse (no presentan el fragmento X1 característico de la integración), y esto se reflejó en la imposibilidad de aislar clones que mantuvieran estos plasmidios en forma estable.

Hasta el momento, la evidencia presentada acerca de la necesidad de integración para la estabilidad del plasmidio, aunque muy consistente es indirecta. Una prueba concluyente es determinar si se logra estabilidad al integrarse los plasmidios que no pueden hacerlo, y que por ende son inestables. El fragmento AD lleva el sitio *att*, que es el sitio por el cual P4 recombina con el cromosoma bacteriano, y que es suplido en *cis*

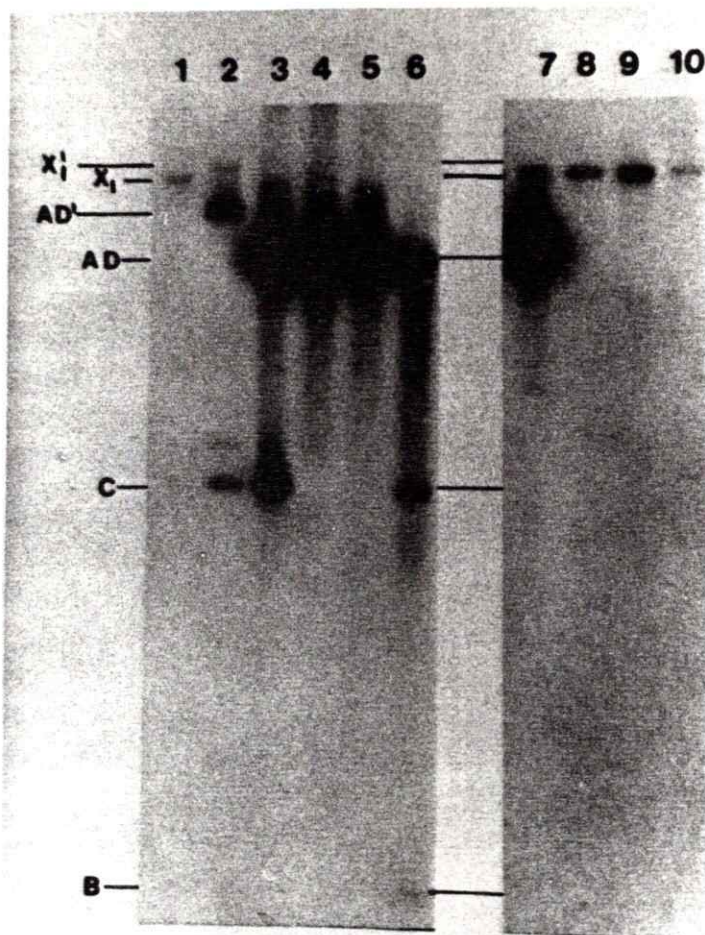


Figura 27. Hibridación del DNA total de mutantes derivadas de pP4 con deleciones de los fragmentos B y C de *EcoRI* por el método de Southern. La transferencia a nitrocelulosa e hibridación del DNA se llevó a cabo como se describió en Materiales y Métodos. Para la construcción de cepas que llevan la deleción del fragmento B de *EcoRI*, como plasmidios estables, se precisó de un virus coadyutor de P4, el cual fue la mutante C1, que provee en *trans* la función *int*. Las células se crecieron en medio LBG con abundante oxigenación a 37°C, salvo cuando se indique un cambio en estas condiciones. En 3, 4 y 5 se adicionó kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml para evitar la segregación del plasmidio. El DNA total de estas cepas se digirió con *EcoRI*. 1) *Cla*(P4*wt*); 2) *Cla*(pP4*vir1**sid1*-Km); 3) *Cla*(pP4*vir1 EcoRI:ADC*-Km); 4) *Cla*(pP4*vir1 EcoRI:AD*-Km); 5) *Cla*(pP4*vir1 EcoRI:AD*-Km) con el fragmento Km orientado en dirección opuesta a en (4); 6) pP4*vir1* purificado a través de gradientes; *Cla*(pP4*vir1 EcoRI:AD*-Km) establecida usando la mutante P4C1, sin cambio en las condiciones de crecimiento (7), sin glucosa (8) y a 30°C (9); 10) *Cla*(P4*wt*). Los fragmentos que no se identifican en la figura, por intensidad y migración corresponden a digestiones parciales. X1' tiene menor migración, ya que el fragmento AD es de mayor tamaño al tener la inserción del transposón *tn5*.

por el plasmidio que se integra. Este sitio está presente en todos estos plasmidios híbridos. La función *int* que codifica para una integrasa putativa puede suplirse en *trans*, y está ausente en estos plasmidios híbridos. Se ha descrito que la mutante CI (Calendar et al., 1981) que es defectiva en la represión de P4, es deficiente en integración. Esta mutante tampoco puede ser mantenida como un plasmidio estable. Por estos dos motivos se eligió esta mutante como coadyutor, que puede suplir en *trans* las funciones necesarias para la integración de P4. Como a su vez los plasmidios híbridos pueden actuar reciprocamente promoviendo la integración de la mutante CI, se siguió el siguiente diseño experimental: la cepa C1a crecida en MLBG se coinfectó a una multiplicidad de infección de 5 con P4CI y con los fagos híbridos que llevan el gen kanamicina. La adsorción se dejó proceder por 10 min a temperatura ambiente, y se diluyó 1:1 con LB-kanamicina a una concentración final de 15 µg/ml. Se incubó a 37°C con agitación durante 60 min, de modo de permitir la expresión del gen *int*. Las células fueron diluidas 1:50 (para diluir el fago no adsorbido remanente) en LB con kanamicina 15 µg/ml, y se incubó en un baño con agitación a 27°C durante la noche. Como la replicación de P4 es muy pobre a temperaturas inferiores a 30°C, se supuso que aquellas células que habían integrado en su cromosoma los plasmidios con el gen de resistencia para kanamicina serían las principales sobrevivientes, en relación a aquellas no infectadas, infectadas sólo con P4CI, o infectadas sólo con el plasmidio híbrido. A continuación, se plaquéó para los sobrevivientes en placas selectivas con 15 µg/ml de kanamicina, las cuales se incubaron

durante 48 horas a temperatura ambiente. De este modo, se trató de favorecer el crecimiento de aquellas colonias que tenían integrados los plasmidios híbridos en el cromosoma, ya que el cromosoma bacteriano es capaz de replicarse a temperatura ambiente, a diferencia del DNA de P4. Para asegurar que el posible plasmidio remanente proveniente de la infección con los fagos híbridos se diluyera, se tomaron 50 colonias de cada clase, las cuales se replicaron en placas selectivas para kanamicina 15 µg/ml, y se incubaron a temperatura ambiente. Las colonias así obtenidas fueron replicadas en placas selectivas con kanamicina 50 µg/ml y algunas de las que crecieron a esta concentración de kanamicina, se les probó la estabilidad a la resistencia a este antibiótico. Se seleccionaron varias colonias con esta característica, pero se eligieron aquellas provenientes de la infección con el fago híbrido AD-kanamicina, en el que el fragmento que contiene el gen de resistencia a kanamicina está orientado desde el fragmento A hacia el D. Resultados preliminares muestran que las células que mantienen este plasmidio de manera estable lo tienen integrado en el cromosoma bacteriano (ver cuadro derecho de la figura 27), y responden a las condiciones de crecimiento. En los resultados mostrados en la figura 27 se observa además, que no hubo recombinación detectable entre la mutante CI y el plasmidio híbrido en cuanto al fragmento B y C se refiere. Estos resultados indican que cuando se suple la función *int* en *trans*, es posible la integración, lo cual confiere la estabilidad al plasmidio. Aunque concluyentes, estos resultados tienen el carácter de preliminar, ya que deberán realizarse estudios más cuidadosos en cepas deficientes en recombinación.

#### EXPRESION DE LOS PRODUCTOS GENICOS DEL PLASMIDIO P4

El estudio de las funciones de P4 se ha hecho en gran medida, en relación al fago P2. De una u otra manera, la gran parte de estas funciones reflejan la interacción que existe entre P4 y P2, y en el estudio de ellas está implicada la presencia de P2. Lee y Goldstein (1985), estudiaron la cinética de aparición de los productos génicos de P4 después de la infección, en ausencia de P2, como un modo de abordar los procesos regulatorios de P4 por sus propios productos génicos. Se hizo indispensable conocer que ocurría con los productos génicos de P4 cuando éste es replicado como un plasmidio estable, para comparar la expresión génica del fago P4 *versus* la del plasmidio. Para hacer este estudio se usaron dos aproximaciones: una fisiológica en presencia de P2, y la otra en ausencia de P2, en la cual se analizaron los productos génicos de pP4.

*Fisiología de pP4 en presencia de P2.* Para hacer estos experimentos se dispuso de la cepa C1a(pP4vir1) y las mutantes derivadas. Como medida de las funciones de *transactivación* y *supresión de polaridad* del plasmidio pP4 propagado en número alto de copias se ensayó lisis celular. Estos ensayos se basaron en la dependencia de P4 por P2 en el desarrollo lítico de P4. El fago P4 es capaz de *transactivar* los 18 genes tardíos de una mutante de P2, P2A<sup>-</sup>, la cual no puede inducir su expresión en ausencia de P4 (Six y Klug, 1973). Entre estos genes tardíos de P2, está el gen K que es responsable de la lisis celular, por lo tanto células infectadas con una mutante P2A<sup>-</sup> no se lisan (Sunshine *et al.*, 1971) (ver figura 28). La *transactivación* de los genes tardíos de esta mutante de



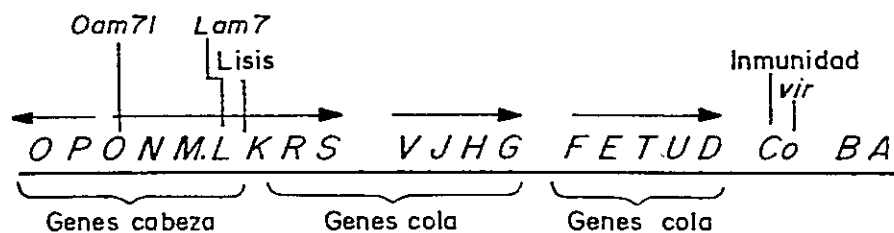


Figura 28. Estructura transcripcional de los operones policistrónicos de los genes tardíos del fago P2. Este mapa se tomó de Geisselsoder et al., (1978), y resume los genes morfológicos de P2. Las flechas sobre los diferentes operones de P2 indican la dirección de la transcripción.

P2 da como resultado lisis celular. Las mutantes  $\delta$  de P4 son incapaces de *transactivar* los genes tardíos de la mutante P2A<sup>-</sup>, por lo que no causan lisis celular (Souza et al., 1977; Kahn et al., 1980). La mutación  $\Delta\alpha\alpha 71$  de P2 (ver figura 28) es fuertemente polar en los 6 genes distales a ella que comprenden un operón, y entre estos genes está el gen de la lisis K. Células infectadas con esta mutante mueren, pero no se lisan (Sunshine et al., 1971). El fago P4 es capaz de suprimir la polaridad transcripcional de esta mutación, permitiendo que las células se lisen (Sunshine et al., 1976). Mutantes de P4 en el gen *psu* son defectivas en supresión de polaridad por lo cual no pueden inducir la lisis celular de una mutante P20 $\alpha\alpha 71$  (Sauer et al., 1981). La coinfección de la mutante polar P20 $\alpha\alpha 71$  con un segundo fago P2 que contiene una mutación diferente pero distal en el mismo operón,  $\Delta\alpha\alpha 7$  (ver figura 28) no complementa ni produce partículas virales, debido a la polaridad de ambas mutaciones (Sunshine et al., 1976). Sin embargo, la coinfección de P4 con estas dos mutantes trae como consecuencia la producción de progenie de P2 y P4, debido a la complementación resultante de la supresión de polaridad transcripcional (Geisselsoder et al., 1978). Las mutantes *psu* de P4 son defectivas en esta actividad, por lo cual no pueden inducir ni lisis celular, ni producción de partículas virales después de coinfectar con estas dos mutantes de P2 (Sauer et al., 1981). La mutante pleiotrópica *sid1* de P4 es parcialmente defectiva en supresión de polaridad (Geisselsoder et al., 1978), y totalmente defectiva en *transactivación* (Shore et al., 1978).

Basados en los ensayos de lisis celular descritos más arriba para

supresión de polaridad y transactivación, se infectaron C1a(pP4*vir1*) y mutantes derivadas propagadas en número alto de copias con los tipos apropiados de mutantes de P2, de modo de ensayar cualitativamente para estas funciones. Los resultados de la figura 29a muestran que el control en el cual se infecta la cepa C1a que no contiene plasmidio, con un fago P2 no defectivo, P2*vir1*, causa lisis celular, la cual no se produce cuando la infección es realizada con las mutantes P2A $\Delta$ 129 ó P20 $\Delta$ 71. En contraste, se observa lisis después de infectar la cepa C1a(pP4*vir1*) crecida en condiciones de número alto de copias, con cualquiera de estas mutantes del fago P2 (figura 29c). A pesar que estos resultados no diferencian entre una expresión constitutiva de pP4 *versus* una inducida por P2, implican que las funciones  $\delta$  y *psu* pueden ser expresadas por pP4. Los niveles de esta expresión como medida de la actividad *psu*, parecen ser reflejo del número de copias de pP4 (figura 29b). Estas mismas funciones fueron ensayadas para las mutantes derivadas de pP4, y se pudo constatar que la mutante *psu1* era incapaz de suprimir polaridad en P20 $\Delta$ 71 (figura 29f), que la mutante  $\delta$ 35 era incapaz de transactivar a la mutante P2A $\Delta$ 129 (figura 29d) y que además las mutantes *sid1* y *psu1* presentaban efectos pleiotrópicos en su capacidad de transactivar a P2A $\Delta$ 129 (figura 29e y f respectivamente). Los efectos pleiotrópicos de estas mutantes se habían descrito anteriormente para el fago P4 (Shore *et al.*, 1978; Sauer *et al.*, 1981). El tiempo que demora en transcurrir la lisis celular después de la infección con P2 de la cepa pP4, es similar al encontrado en la coinfección de los fagos P2 y P4.

En un intento por cuantificar las actividades  $\delta$  y *psu* expresadas por

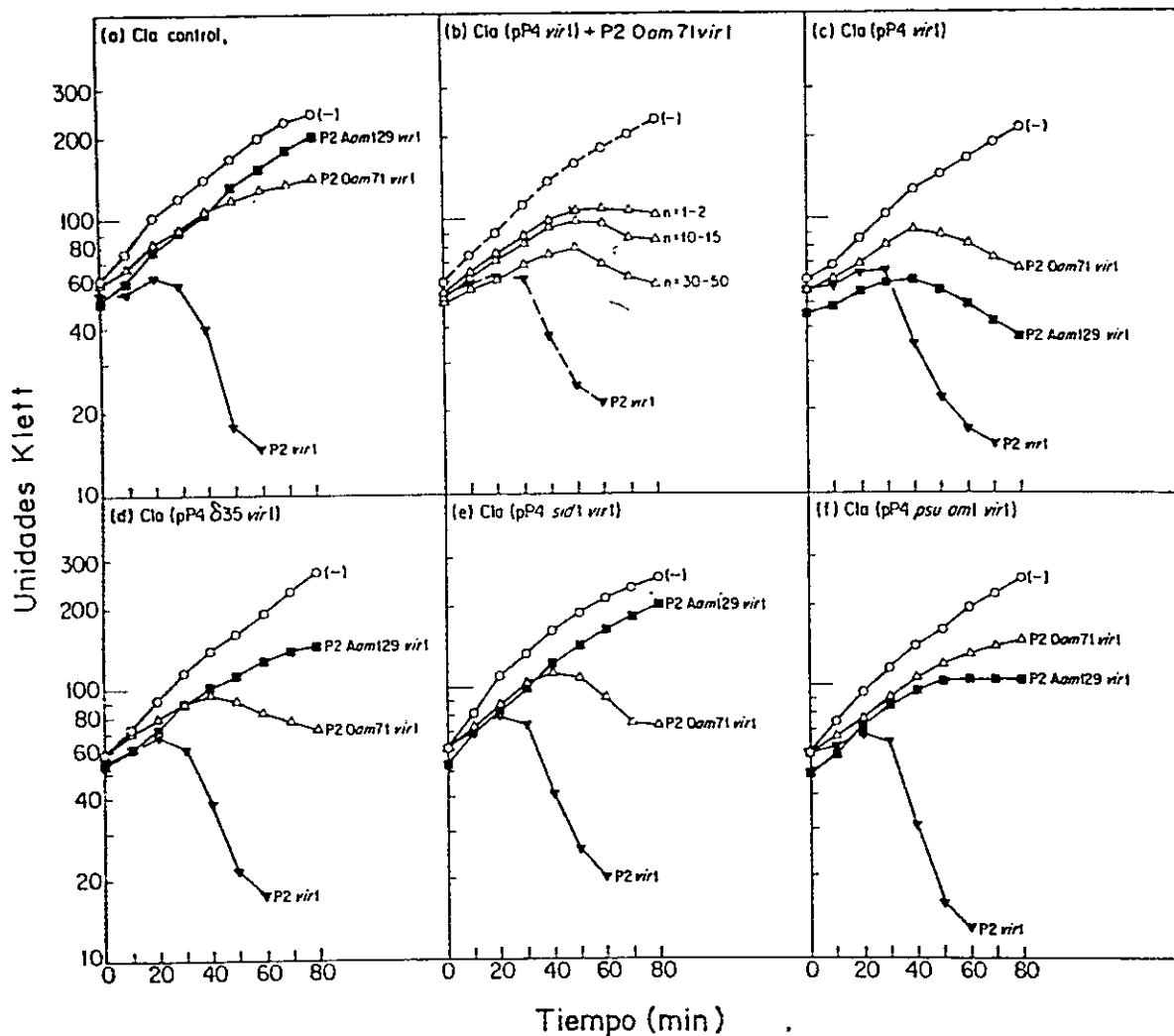


Figura 29. Lisis celular como medida de la expresión de las funciones de transactivación y supresión de polaridad de *pP4*. Los experimentos de lisis celular se realizaron como se describió en Materiales y Métodos. Las células se crecieron en condiciones de número alto de copias (a no ser que indiquen variaciones) y previo a la infección con P2, a una multiplicidad de infección de 10, se suplementaron con Ca y Mg necesarios para la absorción (ver Materiales y Métodos). El tiempo 0 en el gráfico corresponde al momento en que las células se pusieron en un baño a 37°C con agitación después de la infección. a) La cepa huésped (sin el plasmidio) se infectó con P2 $\alpha$ 71vir1, P2A $\alpha$ 129vir1, y P2vir1 que produce lisis celular. En cada cuadro se muestra infección con este último como un control de lisis, además del control sin infectar. b) Cia(pP4vir1) crecida en condiciones de alto, intermedio y bajo número de copias (n) (ver Materiales y Métodos) e infectada con la mutante P2 $\alpha$ 71vir1. c) Cia(pP4vir1) infectada con P2 $\alpha$ 71vir1 y P2A $\alpha$ 129vir1. d) Cia(pP4 $\delta$ 35vir1) infectada con P2 $\alpha$ 71vir1 y P2A $\alpha$ 129vir1. e) Cia(pP4sid1vir1) infectada con P2 $\alpha$ 71vir1 y P2A $\alpha$ 129vir1. f) Cia(pP4psulvir1) infectada con P2 $\alpha$ 71vir1 y P2A $\alpha$ 129vir1.

pP4 propagado en número alto de copias, se midió el tamaño de la explosión de partículas virales de la progenie de P2 y P4 resultante de la infección con P2 y mutantes derivadas. Cuando se mide *transactivación* al infectar con la mutante P2A $\alpha$ 129, el tamaño de la explosión se reduce en alrededor de un 55% en relación a la infección con P2vir1 (Tabla IV), el cual es un resultado similar al encontrado cuando se coinfecta con los fagos P4vir1 y P2A $\alpha$ 129 (Souza *et al.*, 1977). En un experimento análogo, diseñado para probar la actividad *psu* con los fagos mutantes de P2, O $\alpha$ 71 y L $\alpha$ 7, se encontró que el tamaño de la explosión de partículas virales (ver Tabla IV) es similar al encontrado en la coinfección con el virus P4 (Geisselsoder *et al.*, 1978). Como se muestra en la Tabla IV, estas dos funciones fueron probadas para las mutantes  $\delta$ 35, *psu1* y *sid1*, las cuales presentan reducciones en los tamaños de explosión de partículas virales, que se correlacionan bastante bien con los efectos pleiotrópicos observados en experimentos análogos de coinfección con fagos (Souza *et al.*, 1977; Geisselsoder *et al.*, 1978, 1981; Kahn *et al.*, 1980; Sauer *et al.*, 1981). Los resultados obtenidos con este ensayo, al igual que los obtenidos de las curvas de lisis sugieren que las funciones  $\delta$  y *psu* son expresadas en el estado de plasmidio, aunque no se puede diferenciar entre un estado constitutivo o de inducción por el fago P2.

La otra función que es posible medir, es la capacidad de P4 de ensamblar cápsides pequeñas (función *sid*). Shore *et al.*, (1978) demostraron que los viriones P2 y P4 pueden ser fácilmente resueltos por su tamaño, a través de gradientes al equilibrio en CsCl de un lisado

TABLA IV

*Tamaño de explosión de P2 y P4 como medida de las funciones de transactivación y supresión de polaridad en células que llevan pP4*

Cepas pP4 <sub>vir1</sub> infectadas con	Tamaño de explosión de P4		
	P2 <sub>vir1</sub>	P2 <sub>Δa71</sub> 29 <sub>vir1</sub>	P2 <sub>Δa71</sub> 71 <sub>vir1</sub> + P2 <sub>Δa71</sub> 7 <sub>vir1</sub>
C1a(pP4 <sub>vir1</sub> )	31	17	5
C1a(pP4 <sub>psu1</sub> vir1)	8	2,5	0,01
C1a(pP4 <sub>δ35</sub> vir1)	11	1,3	1,5
C1a(pP4 <sub>sid1</sub> vir1)	4	1,1	1,6
	Tamaño de explosión de P2		
C1a(pP4 <sub>vir1</sub> )	39	0,12	0,07
C1a(pP4 <sub>psu1</sub> vir1)	40	0,08	0,04
C1a(pP4 <sub>δ35</sub> vir1)	26	0,08	0,05
C1a(pP4 <sub>sid1</sub> vir1)	69	0,16	0,40

Los experimentos se realizaron como se describió en Materiales y Métodos. La multiplicidad de infección de P2 y mutantes derivadas fue de 5 en todos los casos. Las células se crecieron en LBG con abundante oxigenación a 37°C. Para medir la capacidad de suprimir polaridad de pP4<sub>vir1</sub> se usaron dos mutantes de P2 (*Δa71* y *Δa7*) que complementan y permiten la producción de las proteínas de la cápside. El tamaño de explosión es el número de partículas virales producidas por célula infectada. Células infectadas son centros infectivos menos fago libre. Estos se determinaron como se describió en Materiales y Métodos.

celular: el cociente DNA:proteína entre P2 y P4 siempre resulta en que P2 es más denso, por lo cual éste migra en una banda de mayor densidad que la progenie de P4. La presencia de P2 y P4 se mide como la capacidad de producir "unidades formadoras de placas" (PFU) en la cepa indicadora respectiva. Un típico perfil de separación de las progenies de P2 y P4 se muestra en la figura 30a, producto de la coinfección de la cepa C1a con P2 y P4. Los resultados de la Figura 30b indican que la cepa C1a(pP4vir1) crecida en condiciones de alto número de copias mantiene su capacidad de expresar el producto del gen *sid*, ya que se encontró una progenie de P2 y P4 con tamaños de cápside esperados. En la figura 30c se observan resultados similares a los encontrados por Shore *et al.*, (1978) en una coinfección de P2 con la mutante *sid*. En este caso la infección resulta sólo en la producción de dos clases de progenie de P4vir1sid1: *sidIII* que es el resultado de un tamaño de cápside como el de P2, que contiene un trímero de DNA de P4, que por ende migra a la densidad de P2, y *sidII* de una densidad intermedia, consistente en cápsides del tamaño de P2 que contienen un dímero de DNA de P4. Estos resultados sugieren que hay expresión del producto génico *sid*, pero no disciernen entre niveles constitutivos o inducidos después de la infección con P2. Los perfiles de densidad obtenidos de gradientes al equilibrio de CsCl de lisados celulares con pP4 que llevan las mutaciones *psu* y  $\delta$ , muestran que la infección de estas cepas con el fago P2 resulta en la producción de una progenie de P4, cuya densidad es la esperada para un P4 normal (Figura 30d,e y f).

Otra actividad de P4 que es posible medir en el plasmidio, es la

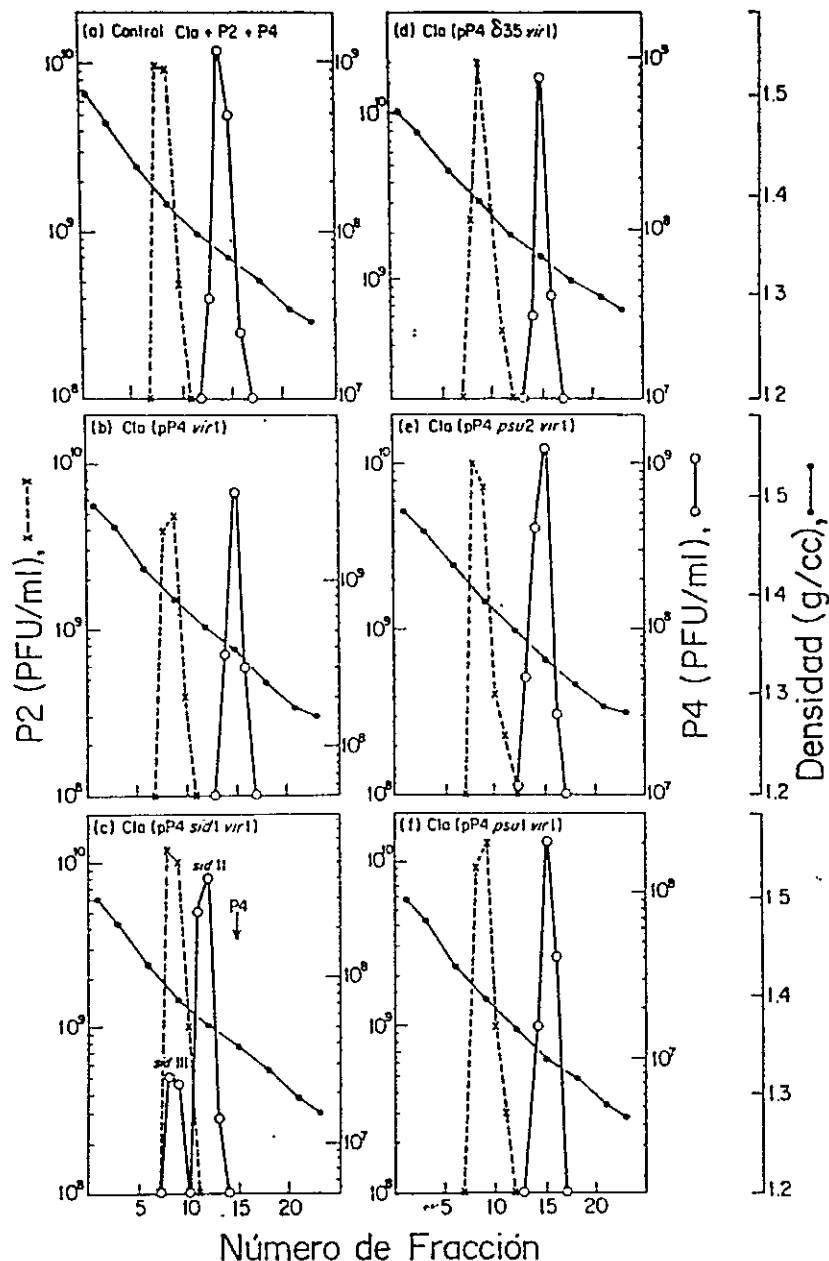


Figura 30. Perfiles de gradientes en *CsCl* de los lisados celulares de *Cla*(pP4vir1) y mutantes derivadas infectados P2vir1. Células que portan pP4vir1 y mutantes derivadas fueron crecidas en condiciones de alto número de copias e infectadas con P2vir1 a una multiplicidad de infección de 10. El lisado celular obtenido se centrifugó en gradientes al equilibrio de *CsCl* para separar las partículas virales de P2 y P4, como se describió en Materiales y Métodos. Se midieron las unidades formadoras de placas (PFU) de P4 (escala derecha) y P2 (escala izquierda). El pico de alta densidad de la izquierda (línea punteada) representa a P2, y el pico de la derecha (línea continua) corresponde a P4. a) Control *Cla* infectada con P2vir1 y P4vir1 simultáneamente. b) *Cla*(pP4vir1) infectada con P2vir1. c) *Cla*(pP4sid1vir1) infectada con P2vir1. d) *Cla*(pP4 $\delta$ 35vir1) infectada con P2vir1. e) *Cla*(pP4psu2vir1) infectada con P2vir1. f) *Cla*(pP4psu1vir1) infectada con P2vir1.



capacidad que tiene P4 de interferir con el desarrollo lítico de P2. Diana et al. (1978) demostraron que P4 interfiere con el desarrollo lítico del fago P2 coinfectante, dirigiendo los operones morfogenéticos de P2 para ensamblar cápsides pequeñas de P4, las cuales son incapaces de encapsidar completamente el genoma grande de P2. Cuando se coinfecta con P2 y P4 al mismo tiempo y a la misma multiplicidad de infección, se encuentra el mismo tamaño de explosión de partículas virales para P2 y P4, pero la explosión de P2 es alrededor de 6 veces menor que la encontrada en ausencia de P4. Más aún, si se usan multiplicidades de infección idénticas, pero P4 es preinfectado 10 min antes que P2, el tamaño de la explosión de las partículas de P4 es aproximadamente 300 veces mayor que aquel encontrado para P2 (condición de máxima interferencia). El gen *sid* parece ser importante en esta interacción, ya que la coinfección de la mutante P4*sid1* con P2, bajo condiciones de máxima interferencia, resulta en un tamaño de explosión de P2 de 2,6 veces mayor que el de la mutante *sid*.

Se pensó que si la expresión génica de P4 mantenido en número alto de copias es equivalente a la encontrada durante el desarrollo de P4 como fago, sería una condición equivalente a la de máxima interferencia. Para probar esta hipótesis, se determinaron los tamaños de explosión de partículas virales de P2 y P4 después de infectar Cl<sub>a</sub>(pP4*vir1*) crecida bajo diferentes condiciones de número de copias, con el fago P2 a distintas multiplicidades de infección. Los resultados presentados en la Tabla V muestran que la producción de progenie de P4, es aproximadamente equivalente al número de copias del plasmidio pP4 de

TABLA V

*Tamaño de explosión de P2 y P4 en la cepa C1a(pP4vir1) infectada con P2*

Número de copias de C1a(pP4vir1)	Tamaño de explosión de P4		
	MOI de P2 2	MOI de P2 10	MOI de P2 30
Bajo (n=1-2)	2,6	1,1	0,7
Intermedio (n=10-15)	14,0	9,0	8,0
Alto (n=30-40)	24,0	21,0	17,0

Número de copias de C1a(pP4vir1)	Tamaño de explosión de P2		
	MOI de P2 2	MOI de P2 10	MOI de P2 30
Bajo (n=1-2)	66	80	110
Intermedio (n=10-15)	32	44	45
Alto (n=30-40)	61	41	42

Los experimentos se realizaron como se describió en Materiales y Métodos. C1a(pP4vir1) se creció bajo diferentes condiciones, de modo de obtener un número de copias alto, intermedio y bajo. La multiplicidad de infección (MOI) está indicada en la tabla. El tamaño de explosión de P2 y P4 se determinó como se describió en la leyenda de la Tabla IV.

la cepa infectada. Además, el tamaño de la explosión de las partículas de P2 indica que no hay un nivel significativo de interferencia como los encontrados por Diana et al., (1978). Este resultado inesperado implicaría la existencia de niveles más bajos de expresión génica de pP4 al menos para el gen *sid*.

Como se discutió anteriormente, los experimentos para medir las funciones  $\delta$ , *psu* y *sid* en presencia del fago P2, no prueban que estos productos génicos estén presentes, ya que puede existir una transactivación de P2 hacia P4 de modo de inducir, o aumentar la expresión génica de P4 (Barrett et al., 1976). El nivel de el o los productos génicos de pP4 implicados en el fenómeno de interferencia están alterados. Para resolver este problema se decidió estudiar los niveles de los productos génicos de pP4 en ausencia de P2.

*Análisis de la expresión de los productos génicos producidos por pP4.* El método utilizado en el análisis de los productos génicos de pP4 en ausencia de P2 fue la observación directa de las proteínas expresadas por pP4. Se marcaron las proteínas con [<sup>35</sup>S]-metionina y se resolvieron a través de electroforesis en gradiente de poliacrilamida. La comparación de estos resultados con aquellos obtenidos previamente en la infección con el fago P4, permitirá diferenciar cualquier patrón nuevo de expresión de pP4.

Se usó como huésped la cepa C3103, que es *uvrA*, y había sido usada previamente para estudios similares de infección con el fago P4 (Geisselsoder et al., 1981; Lee y Goldstein, 1985), y en la cual pP4 se

propaga en número alto de copias. Se buscaron las condiciones óptimas de irradiación con luz ultravioleta en las cuales hay expresión de las proteínas de pP4. Dado que el genoma del plasmidio está representado un gran número de veces, y que es más compacto que el DNA cromosomal, el DNA de pP4 será menos afectado por la irradiación que el DNA bacteriano. Así, la síntesis de proteínas codificadas por genes cromosomales se verá considerablemente reducida comparado con la síntesis de proteínas codificadas por el plasmidio. Se usó el mismo razonamiento que para establecer las condiciones de irradiación con luz ultravioleta en maximocélulas (Sancar *et al.*, 1979). Las condiciones establecidas para la irradiación, se describieron en Materiales y Métodos.

En la figura 31 se muestra una autoradiografía de las proteínas resueltas por geles en gradientes SDS-poliacrilamida. La mutante que tiene la delección  $\Delta 10$ , C3103(pP4 $\Delta 10$ ), se presenta como un control, ya que esta delección elimina la expresión del producto génico 2, que es fácilmente resuelto por sus niveles altos y constitutivos de expresión génica (Barrett *et al.*, 1976; Geisselsoder *et al.*, 1981). Un segundo control mostrado en esta autoradiografía, es un extracto proveniente de la infección de la cepa C3103 con P4 en ausencia de P2, ya que provee una indicación de la localización y de los niveles de expresión de los productos génicos del fago P4. La diferencia observada en las proteínas bacterianas en las posiciones 1 y 2 con respecto al resto, se debe a que en 1 y 2 las células fueron crecidas en TPG, método tradicional en la infección con P4. Para lograr alto número de copias, las cepas pP4 fueron crecidas en LB6. Las proteínas  $\alpha$  y psu no son detectables en el

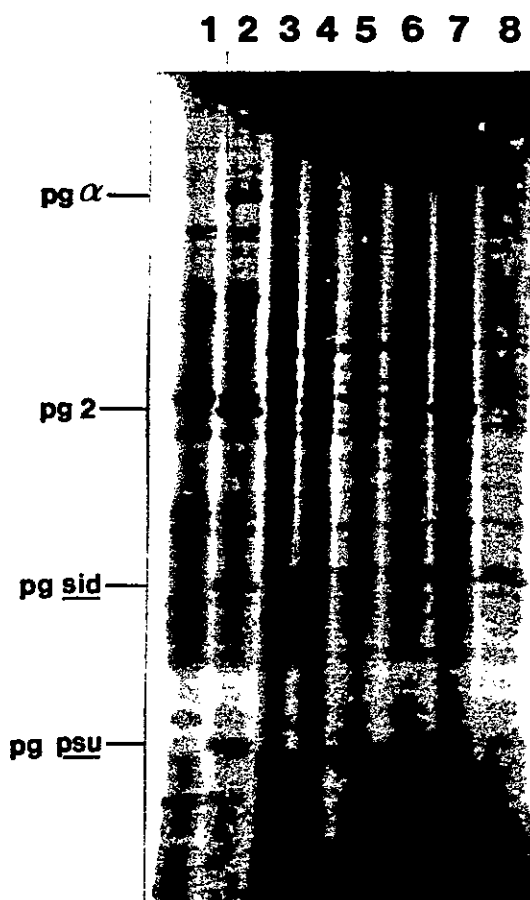


Figura 31. Expresión de los productos génicos de pP4 medida a través de marcación con [ $^{35}$ S]-metionina. La cepa C3103 y derivadas que portan el plasmidio P4 se irradiaron con luz ultravioleta, se marcaron con [ $^{35}$ S]-metionina y se sometieron a electroforesis en gradiente de poliacrilamida (7,5-15,0%), como se describió en Materiales y Métodos. La cepa C3103 no infectada (1) y la infectada con el fago P4 a una multiplicidad de infección de 10 (2) se crecieron en TPG (ver Materiales y Métodos). La intensidad de la irradiación con luz ultravioleta fue de 105 J/m $^2$ . Después de la irradiación, la cepa C3103 se infectó con P4 y se incubó en un baño con agitación durante 90 min a 37°C, de modo de observar la expresión de los genes tempranos y tardíos de P4. Las cepas C3103 (3), C3103(pP4 $\Delta$ vir1) (4) y C3103(pP4 $\Delta$ 10vir1) (5), se crecieron en medio LBG a 37°C con aireación y se irradiaron con luz ultravioleta a una intensidad de 20 J/m $^2$ . Posteriormente, se incubaron a 37°C con agitación durante 15 minutos y se marcaron con [ $^{35}$ S]-metionina. 6, 7 y 8 son como 3, 4 y 5 a excepción que la incubación después de la irradiación fue por 90 minutos en vez de 15. La autorradiografía se llevó a cabo como se describió en Materiales y Métodos. La abreviatura pg significa producto génico.

estado de plasmidio, en tanto que la proteína sid aparece como una banda débil, y sólo la proteína 2 se expresa en niveles similares a los observados durante la infección con el fago P4.

Los niveles extremadamente bajos de expresión génica de algunas proteínas de pP4, podrían ser atribuidos a un efecto de dosis genética, es decir que durante la infección con el fago P4 existieran muchas más copias de P4 que las presentes en el estado de plasmidio. Esta posibilidad queda descartada por los resultados mostrados en la figura 14, en la que se muestra la cinética del número de copias después de la infección con el fago P4, y está resumida en la Tabla VI. Los números de copias mostrados en la Tabla VI muestran que no hay una diferencia sustancial en el número de genomas de P4 presente intracelularmente durante los primeros 90 min después de la infección con el fago P4. La similitud en el número de copias encontrada cuando pP4 se propaga en número alto y la determinada después de la infección, contrasta con la disparidad en los niveles de expresión génica determinada por el análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida.

Las proteínas psu y sid que regulan la expresión de  $\alpha$ , podrían jugar un papel importante en la regulación de la expresión de los productos génicos de P4. Se ha pensado que estas dos proteínas actúan como antiterminadores de la transcripción, que de algún modo antagonizan con el factor rho (Sunshine et al., 1976; Geisselsoder et al., 1978). Como un primer paso para el estudio de la interacción de estos antiterminadores putativos y el factor rho se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

TABLA VI

*Cinética del número de copias después de infectar la cepa C3103 con P4vir1.*

Infección	Tiempo después de la infección	Número de copias
C3103 + P4vir1	15 min	37
C3103 + P4vir1	45 min	46
C3103 + P4vir1	90 min	48
C3103 + P4vir1	150 min	54
C3103(pP4vir1)	-	33

Los resultados que se presentan en esta tabla resumen aquellos que se mostraron en la figura 14. Se incluye el número de copias de C3103(pP4vir1) con propósitos comparativos.

*Efecto de mutaciones en el factor rho en la mantención de pP4.* Las bases para pensar que las proteínas *psu* y *sid* son antiterminadores que antagonizan con *rho*, son que en ambos casos, una mutación en el factor *rho* es capaz de reemplazar las actividades ejercidas por estas proteínas en P2. Antes que la función *psu* fuera descubierta, Sunshine et al., (1971) describieron que el efecto polar de mutaciones ámbar en operones policistrónicos de P2 podía ser suprimido en un huésped defectivo para *rho*, que lleva el alelo *suA* (Beckwith, 1963). Más tarde (Sunshine et al., 1976), se descubrió que P4 podía suprimir el efecto polar de mutaciones ámbar de P2 en un huésped  $\rho^+$ , y que el gen responsable de esta actividad era *psu*. Por otro lado, Geisselsoder et al., (1978), descubrieron que el efecto de la mutante *sid* se anulaba en un huésped defectivo en *rho*. El alelo usado en estos experimentos fue el *rho102* (Korn y Yanofsky, 1976). Cuando se coinfectaba P2 y P4*sid1* en un huésped  $\rho^+$ , las cápsidas producidas para empacar P4 eran grandes (diámetro de 575 Å), que es el tamaño de las cápsidas de P2. Al repetir este experimento usando esta vez un huésped *rho102*, se suprimió el efecto de la mutación *sid*, y P4 fue empacado en cápsidas pequeñas normales para P4 (diámetro de 475 Å). Más aún, cuando se infectó sólo con P2 en este huésped *rho* defectivo (*rho102*), se obtuvo que un alto porcentaje de las cápsidas producidas eran pequeñas.

A la luz de estos resultados, los que muestran que hay una relación antagónica entre el factor *rho* y *psu* y *sid*, se intentó determinar de qué modo el factor *rho* afecta la mantención del plasmidio. Para estos estudios se usó el alelo *rho102*. Como se muestra en la Tabla VII,



TABLA VII

*Efecto del alelo rho102 en la mantención de pP4*

Mutación de P4	Producto génico afectado	Mantención en $\rho^+$	Mantención en $\rho^-$	Efecto de P4 en huésped $\rho$ 102
<i>vir1</i>	-	+	-	Sin sobrevivientes después de infectar con P4.
<i>vir1psu1</i>	psu	+	±	Sobrevivientes que llevan P4 crecen pobremente.
<i>vir1835</i>	sid	+	±	Las células finalmente pierden pP4.
<i>vir1sid1</i>	sid	+	±	
<i>vir18inv9</i>	psu y sid	+	+	Mantención y crecimiento normal.
<i>vir18inv11</i>	psu y sid	+	+	Mantención y crecimiento normal.

En la tabla se presenta un resumen del efecto que produce una mutación en  $\rho$  sobre la mantención de pP4 y mutantes derivadas.

resultó imposible mantener pP4 en esta cepa rho defectiva. Después de infectar esta cepa con P4, hay un gran porcentaje de muerte celular (99%), y ninguno de los sobrevivientes lleva pP4. En experimentos similares usando las mutantes *psu*, *sid*, o  $\delta 35$ , se encuentran clones que llevan pP4, pero las células son de una apariencia muy alterada, y después de pocas generaciones son curadas de pP4. Sin embargo, cuando estos experimentos se repiten usando las dobles mutantes construidas *in vitro*,  $\delta inv9$  y  $\delta inv11$ , las cuales no producen los productos *sid* y *psu*, éstas pueden ser mantenidas como plasmidios en este huésped rho defectivo, siendo la apariencia de las colonias similar a la de células no infectadas. Estos resultados sugieren que hay interacción entre los productos génicos *psu* y *sid* y el factor de terminación rho, que afecta la mantención del plasmidio.

Para determinar si el efecto de rho en la mantención del plasmidio es un efecto en la replicación del DNA (es decir que se produjese una pérdida del control de la replicación del DNA de pP4 traducándose en un efecto letal sobre las células), se hizo una cinética del número de copias después de infectar la cepa *rho102* con el fago P4. Estos resultados se muestran en la Tabla VIII, en la cual se aprecia que no hay una diferencia significativa en la replicación de P4 en la cepa defectiva para rho con respecto a su cepa isogénica rho\*.

Adicionalmente, se intentó establecer un plasmidio mutante en la función  $\epsilon$  (implicada en la desrepresión de P2), en esta cepa defectiva para rho, ya que la mutación en  $\epsilon$  es ámbar, y puede tener un efecto polar sobre genes que estén distales a ella. Se estableció fácilmente

TABLA VIII

*Cinética del número de copias de pP4 después de la infección en un huésped que porta el alelo rho102*

Tiempo después de infección (min)	número de copias	
	<i>rho</i> <sup>+</sup>	<i>rho</i> 102
15	39	50
45	46	47
90	45	42
150	54	30

La infección y determinación del número de copias se realizó a través de gradientes como se describió en Materiales y Métodos. Se usaron como cepas huéspedes la cepa C3104 defectiva en el alelo *rho*102 y su cepa isogénica C3103 (*rho*<sup>+</sup>).

esta mutante en la cepa *rho102*, lo que sugiere que el efecto de la mutación ámbar de  $\epsilon$  es a nivel de la transcripción, y que no es el gen  $\epsilon$  en si mismo el necesario para la mantención del plasmidio.

Se determinó si las mutantes que son mantenidas en esta cepa *rho* defectiva, mantienen las propiedades de manipulación del número de copias por condiciones de crecimiento. Este análisis se hizo por electroforesis en agarosa, el cual se muestra en la Figura 32. Aquí se aprecia que en la cepa isogénicas *rho+*, en la que se establecieron las mutantes  $\delta inv9$  y  $\delta inv11$ , se produce el comportamiento esperado. Este comportamiento es similar al encontrado en *Cla*, vale decir el número de copias de  $\delta inv9$  no responde a las condiciones de crecimiento, mientras que  $\delta inv11$  sí lo hace. El número de copias de estas mutantes y de  $\epsilon_{\Delta 104}$  establecidas en la cepa *rho102*, no responden a las condiciones de crecimiento, alcanzando un nivel intermedio en todos los casos (ver Figura 32). Se encontró que estas tres mutantes de P4 están integradas en el cromosoma bacteriano de la cepa *rho102*, lo que le confiere estabilidad al plasmidio.

Se determinó con precisión el número de copias de la mutante  $\epsilon_{\Delta 104}$  crecida bajo diferentes condiciones, a través de centrifugación al equilibrio en gradientes *CsCl*-yoduro de propidio. En la figura 33 se confirman los resultados obtenidos mediante geles de agarosa. El número de copias obtenido en las condiciones restrictivas fluctúa entre 11 y 15, en tanto que en condiciones óptimas alcanza a 27.

Con el propósito de determinar si la interacción entre los productos génicos *psu* y *sid* de P4 y el factor *rho* defectivo es alelo-específica,

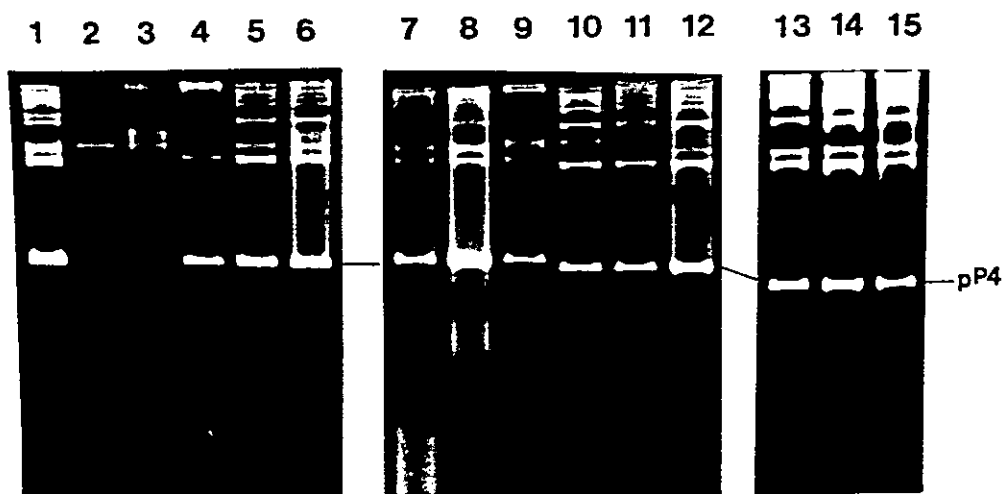


Figura 32. Determinación semicuantitativa del número de copias de mutantes de P4 establecidas en la cepa C3104, defectiva en el alelo *rho102* mediante electroforesis en geles de agarosa. La preparación y posterior electroforesis del DNA se realizó como se describió en la leyenda de la figura 18. Las células se crecieron en medio LBG a 37°C con aireación, a excepción que se indique un cambio en estas condiciones. C3103(pP4 $\delta$ inv11vir1) crecida como está descrito (1), sin glucosa (2), y a 30°C (3). C3104(pP4 $\delta$ inv11vir1) crecida como está descrito (4), sin glucosa (5), y a 30°C (6). C3104(pP4 $\epsilon$ ax104vir1) crecida como está descrito (7), sin glucosa (8), y a 30°C (9). C3104(pP4 $\delta$ inv9vir1) crecida como está descrito (10), sin glucosa (11), y a 30°C (12). C3103(pP4 $\delta$ inv9vir1) crecida como está descrito (13), sin glucosa (14), y a 30°C (15).

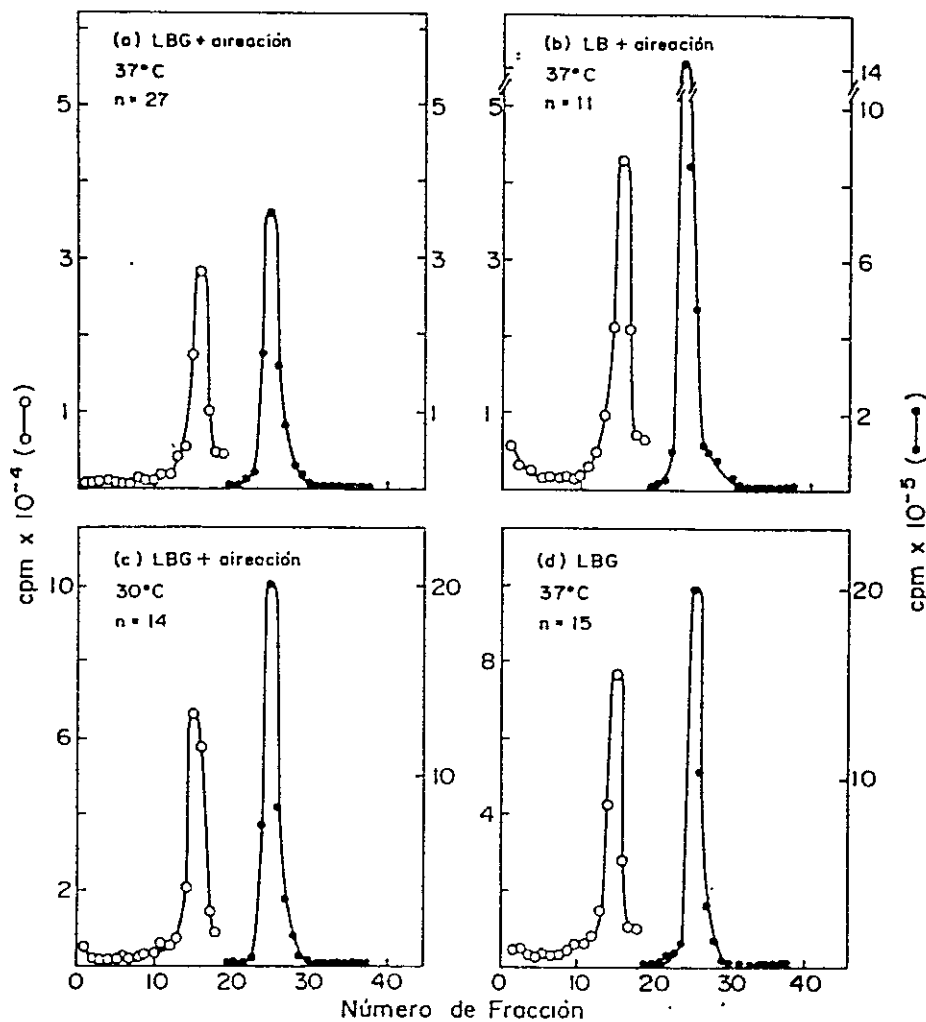


Figura 33. Número de copias de la cepa C3104(pF46 $\Delta$ x104vir1) (defectiva en el alelo rho102) crecida bajo diferentes condiciones. Los gradientes de CsCl-yoduro de propidio se realizaron como se describió en Materiales y Métodos. Las células se crecieron en medio LBG con aireación a 37°C (a); sin glucosa (b); a 30°C (c); sin aireación (d).

se probó el efecto de otros alelos de rho sobre la mantención del plasmidio. Se usó el alelo *suA* (Beckwith, 1963), que tiene una mutación débil en el factor rho. En esta cepa fue posible establecer pP4 sin dificultad, como asimismo las mutantes derivadas *psu1*, *sid1*,  $\delta 35$ , *delta inv9*, *delta inv11* y  $\epsilon a \delta 104$ . Esto sugiere que el efecto es alelo específico, es decir, que la interacción de los productos génicos de P4 con un factor rho defectivo depende del tipo de alteración en rho. En la figura 34 se muestra que el número de copias de pP4 en *suA*, determinado semicuantitativamente mediante geles de agarosa, responde a las condiciones de crecimiento. Lo mismo ocurre con las mutantes *delta inv11* y  $\epsilon a \delta 104$ , mientras que el número de copias de la mutante *delta inv9* no responde a las condiciones de crecimiento. De los resultados obtenidos con las mutantes *rho102* y *suA* se infiere que la pérdida del control del número de copias por las condiciones de crecimiento de *delta inv11* y  $\epsilon a \delta 104$  en el huésped *rho102*, es un efecto lateral de la mutación en rho, no así el de *delta inv9* que es una propiedad inherente de la mutación en P4.

En forma preliminar se probó el efecto del alelo *rho201* sobre la mantención de pP4 (Guarente *et al.*, 1977), que tiene una mutación severa en el factor rho. Al infectar con P4 y mutantes derivadas, no se observa un efecto letal apreciable, y P4 aparentemente no logra replicarse en esta cepa. En la cepa isogénica *rho+*, P4 se propaga como profago. La mutación *rho201* puede ser corregida por una segunda mutación, esta vez en la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (*rpo203*). Cuando ambas mutaciones están presentes, se restaura la terminación de la transcripción (Guarente y Beckwith, 1978). Si se infecta esta doble mutante con P4 o

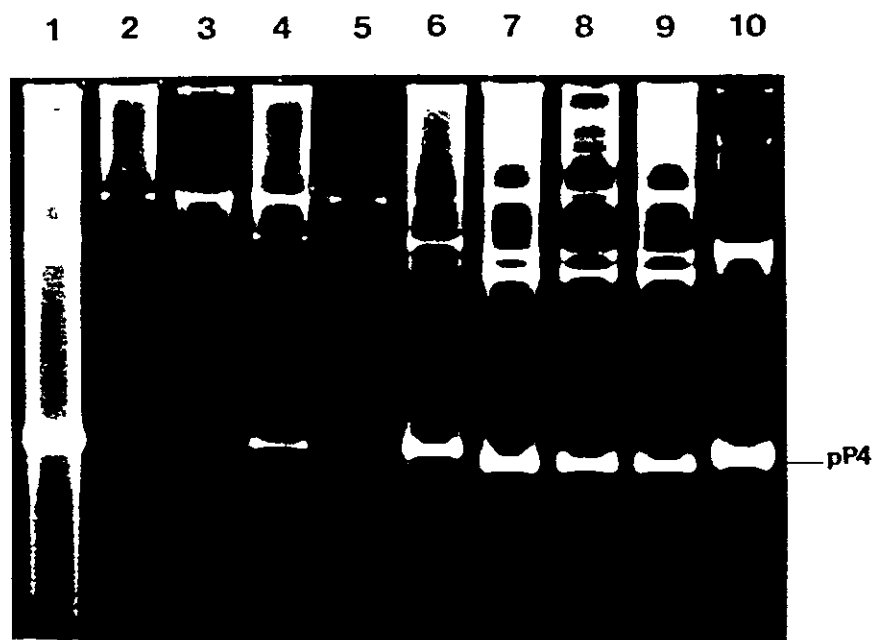


Figura 34. Determinación semicuantitativa del número de copias de pP4 y mutantes derivadas establecidas en la cepa C1844 (*suA*) mediante electroforesis en geles de agarosa. La extracción y electroforesis del DNA se llevó a cabo como se describió en la leyenda de la figura 18. La cepa C1844 es rho defectiva en el alelo *suA*. Las células se crecieron en medio LBG a 37°C con aireación a excepción que se indique un cambio en estas condiciones. C1844(pP4*vir1*) como está descrito (1), sin glucosa (2), y a 30°C (3); C1844(pP4 $\epsilon$  $\Delta$ 104*vir1*) sin glucosa (4), a 30°C (5), y como está descrito (6); C1844(pP4 $\delta$ *inv9vir1*) como está descrito (7), sin glucosa (8) y a 30°C (9); pP4*vir1* purificado a través de gradientes de CsCl (10).



mutantes derivadas, se observa que hay un enorme efecto letal: sólo el 0,1% de las células sobrevive la infección, y ninguna de las sobrevivientes lleva P4. Este efecto no se advierte cuando la mutante *rpo203* es infectada con P4 o mutantes derivadas, y al igual que cuando se infecta un huésped *rpo201*, no hay crecimiento de P4. Esto refuerza la idea de una interacción entre productos de P4 y rho, ya sea directamente o compitiendo por el sitio en la RNA polimerasa.

Estos resultados son sugerentes de una actividad codificada por P4 que es antagónica con rho, pero no hay una evidencia directa y concluyente que pruebe este punto. El descubrimiento que P4 puede propagarse como plasmidio, y la construcción de plasmidios híbridos derivados, facilitó enormemente el estudio de esta actividad, y en la sección presentada a continuación se detallan los experimentos realizados que prueban que pP4 codifica para una función antiterminadora de la transcripción.

*pP4 codifica para una función antiterminadora de la transcripción.* Para este estudio se dispuso de plasmidios de P4 híbridos, y de un operón bacteriano muy bien caracterizado en el cual se puede estudiar la actividad potencial de P4 de antiterminar. La cepa huésped escogida fue X8605, que presenta una deleción que deja el operón lactosa adyacente al operón triptófano (Guarente y Beckwith, 1978). La señal de terminación de la transcripción rho-dependiente que está al final del operón del triptófano está intacta, mientras que el promotor del operón de la lactosa tiene una deleción parcial. Dada la configuración de estos dos operones, la proteína rho impide la transcripción hacia el operón de

la lactosa en la cepa X8605, por la acción del terminador localizado al final del operón del triptófano (figura 35). El antagonismo a la terminación de la transcripción mediada por rho se puede ensayar fácilmente, y se detecta directamente por la lectura hacia el operón de la lactosa midiendo la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La idea consiste en introducir en X8605 un plasmidio híbrido de P4, que conste del fragmento AD de *EcoRI* (para evitar la integración de P4), ligado al gen kanamicina (de modo de seleccionar fácilmente el plasmidio). Para la construcción de este plasmidio se siguió el esquema señalado en la figura 36. Para determinar cual de los genes de P4 es responsable de la actividad antiterminadora, se construyeron híbridos derivados que llevan mutaciones en el genoma de P4. Afortunadamente, como las mutaciones deseadas están localizadas en el fragmento AD de *EcoRI*, se siguió el mismo esquema para las construcciones.

En la Tabla IX se muestran las mutantes usadas, y un resumen de las proteínas que están ausentes en estas mutantes, lo cual ayudará a visualizar cuales de estas proteínas son las responsables de la actividad antiterminadora. La localización de las mutaciones se muestra en la figura 24 y 38. Estas mutantes se establecieron en la cepa X8605, seleccionando aquellas que tienen el gen kanamicina en la misma orientación, de modo que los resultados sean absolutamente comparables. En la figura 37 se muestra una electroforesis en geles de agarosa donde los plasmidios AD-kanamicina fueron digeridos con la enzimas *HindIII*, lo cual da un patrón típico de digestión, dependiendo de la orientación del fragmento kanamicina. En la leyenda de la figura 37 se detallan estas

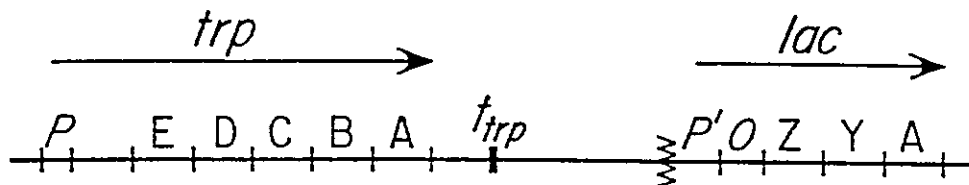


Figura 35. La region *trp-lac* de la cepa de *E. coli* X8605. La distancia entre el terminador *trpA* y la unión con el operón lactosa es de 1800 pares de bases. El promotor *lac* (*P'*) tiene una deleción parcial, por lo que requiere una lectura continuada desde el operón triptófano, a través del terminador rho-dependiente del triptófano hacia el operón lactosa, para la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa (Tomado de Guarente y Beckwith, 1978).

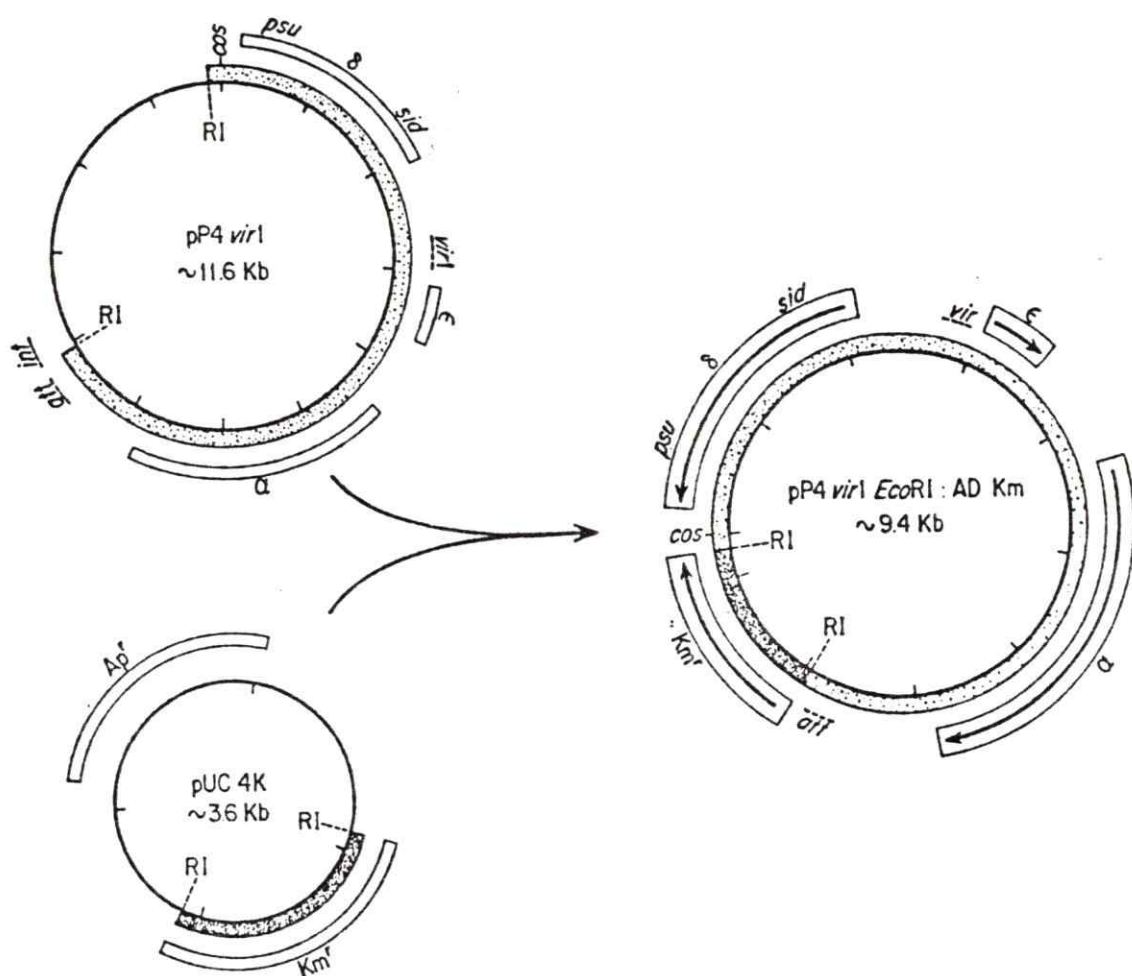


Figura 36. Construcción de los derivados de pP4vir1 EcoRI:AD-Km. El DNA del plasmidio P4vir1 se digirió con la endonucleasa EcoRI. El fragmento EcoRI:AD de 8,2 kilobases (figura 24) se ligó con el fragmento EcoRI de 1,2 kb de pUC4K, que contiene el gen de resistencia a kanamicina. La orientación de este gen se determinó por análisis en electroforesis de una digestión con HindIII (ver figura 37). En la construcción de este plasmidio y de mutantes derivadas, se escogieron clones en los cuales el gen de resistencia a kanamicina está ligado siempre en la misma orientación. Todos los plasmidios así construidos pueden ser propagados como fagos cuando las células son infectadas con P2. A diferencia de pP4vir1, estos plasmidios son incapaces de integrarse dentro del cromosoma del huésped, ya que no tienen el gen *int* necesario para la integración.

TABLA IX

*Expresión de los productos génicos psu y sid por mutantes de P4*

Mutante de P4	Fenotipo (productos génicos)	
	psu	sid
<i>vir1</i>	+	+
<i>vir1psu1</i>	-	+
<i>vir1δinv11</i>	-	-
<i>vir1sid1</i>	± (niveles bajos)	-
<i>vir1δ35</i>	+	-

Todas las mutantes llevan la mutación *vir1* necesaria para la mantención del plasmidio.

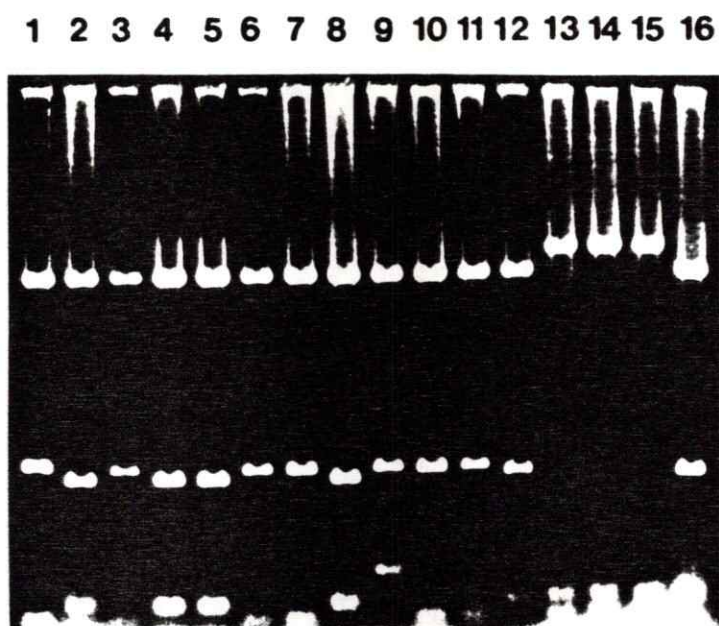


Figura 37. Determinación de la orientación del fragmento que lleva el gen de resistencia a kanamicina en los derivados de pP4vir1 EcoRI:AD-Km. La transformación en X8605 se realizó como se describió en Materiales y Métodos. Los clones se seleccionaron para resistencia a kanamicina y sensibilidad a ampicilina. Estos clones, se analizaron a través de electroforesis en agarosa, y aquellos que presentaban el fragmento EcoRI:AD de P4 y el fragmento kanamicina, fueron analizados en mayor detalle para establecer la orientación de este último. El DNA de estos clones (esta figura) se digirió con la enzima *Hind*III, al igual que en la figura 26. En (16) está el control con el fragmento kanamicina orientado como se indica en la figura 36. (1, 2 y 3) pP4vir1sid1 EcoRI:AD-Km; (4, 5 y 6) pP4vir1psul EcoRI:AD-Km; (7, 8 y 9) pP4vir1δ35 EcoRI:AD-Km; (10, 11 y 12) pP4vir1δinv9 EcoRI:AD-Km; (13, 14 y 15) pP4vir1δinv11 EcoRI:AD-Km; (16) pP4vir1 EcoRI:AD-Km. Los clones de las posiciones 2, 4, 5, 8 y 12 presentan la orientación deseada. Los clones correspondientes a la mutante *δinv11* son más complejos de analizar, ya que al invertir el fragmento *Bam*HI:B, el corte interno de *Hind*III es desplazado, dando lugar a un fragmento más grande que el fragmento *Hind*III:B. Esta nueva orientación origina además un fragmento más pequeño de *Hind*III, debido a que el corte de *Bam*HI:B de la derecha queda más cerca del corte *Hind* III. Este fragmento es de alrededor 530 pares de bases. Con la orientación deseada del gen kanamicina, se predice un fragmento de 780 pares de bases, y un fragmento de 680 pares de bases si tiene la orientación inversa. Los 3 clones analizados (13, 14 y 15) presentan el fragmento de 760 pares de bases (orientación deseada). El cálculo del tamaño del fragmento se hizo por aproximación, ya que presenta una migración muy similar a la del fragmento de 780 pares de bases del control (16) (ver detalles en la leyenda de la figura 26).



digestiones y los pesos moleculares esperados, de acuerdo a la orientación de los fragmentos. La mantención de estos plasmidios se hizo en presencia de kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$  y éstos se propagan en número alto de copias, lo que se determinó cualitativamente por electroforesis en geles de agarosa (no se muestra).

La capacidad de pP4 de impedir la terminación de la transcripción, en *trans*, en el terminador del operón del triptófano del cromosoma bacteriano, se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa de X8605 *i/v*<sup>-</sup>. Los resultados que se muestran en la Tabla X indican que pP4<sub>vir1</sub> EcoRI:AD-Km antagoniza la terminación de la transcripción en el terminador del triptófano, ya que se encontró un aumento de alrededor de 20 veces de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en relación al control sin el plasmidio, o con el plasmidio pUC4K. En contraste, la capacidad de antiterminar de un análogo de pP4 que lleva una mutación ámbar en el gen *psu*, es nula (ver Tabla X). Este ensayo también demuestra que el derivado que lleva la mutación  $\delta inv11$ , que no expresa las proteínas *psu* y *sid*, ha perdido la capacidad de antiterminar. La mutación *sid* que afecta negativamente el gen *psu* causa que la actividad antiterminadora sea baja. En cambio, cuando se usa el plasmidio con la mutación  $\delta 35$ , la que se sabe produce niveles casi normales de proteína *psu*, expresa un aumento de actividad de  $\beta$ -galactosidasa de 13 veces con respecto del control. En condiciones similares (en ausencia del fago P2), esta mutante no produce el producto génico *sid*. Estos resultados sugieren que sólo el producto génico *psu*, y no *sid*, es responsable de la capacidad de pP4 de impedir la terminación de la transcripción en el terminador

TABLA X

*Expresión de la  $\beta$ -galactosidasa como medida de la terminación de la transcripción en el terminador del operón del triptófano.*

Cepa	Unidades $\beta$ -gal
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup>	5,9 $\pm$ 0,1
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pUC4K	3,8 $\pm$ 0,1
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pP4vir1 <i>EcoRI</i> :AD-Km	90 $\pm$ 7
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pP4vir1psul <i>EcoRI</i> :AD-Km	4,9 $\pm$ 0,6
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pP4vir1 $\delta$ inv11 <i>EcoRI</i> :AD-Km	5,5 $\pm$ 0,7
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pP4vir1sid1 <i>EcoRI</i> :AD-Km	11,1 $\pm$ 0,9
XB605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pP4vir1 $\delta$ 35 <i>EcoRI</i> :AD-Km	65 $\pm$ 1
XB605 <i>rho</i> 201	178 $\pm$ 5

Los resultados de la tabla son el promedio de dos mediciones. Las unidades están expresadas de acuerdo a Miller (1972). El crecimiento de las células y ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa se hizo como se describió en Materiales y Métodos. Las cepas se construyeron por transfección o transformación, y se usó kanamicina 50  $\mu$ g/ml para mantener pP4. El marcador *ilv*<sup>-</sup> cerca del gen *rho* en el cromosoma de *E. coli* es un marcador selectivo para la transducción con P1, y no está relacionado con este trabajo.



del operón del triptófano.

Cuando el fragmento AD de *EcoRI* de P4 es insertado en el sitio *EcoRI* del plasmidio vector pBR325, la  $\beta$ -galactosidasa se expresa pobremente en la cepa X8605, en niveles que no son significativamente diferentes de la cepa transformada con pBR325, o sin plasmidio (no se muestra). Esos híbridos P4:pBR325 producen niveles de la proteína  $\alpha$  que son muy bajos (Jiang y Goldstein, en preparación), por lo cual se tuvo que determinar si el producto del gen  $\alpha$  es necesario en la expresión de la actividad antiterminadora. Se transformó la cepa X8605 con un plasmidio híbrido, pJG76, el cual lleva el fragmento de DNA de P4 comprendido entre los sitios *AvaI* y *BamHI* (ver figura 38), en el cual se codifica sólo el gen *psu* y otros genes no esenciales de P4. Ni el gen  $\alpha$  ni el *sid* están presentes. El gen *psu* llevado por pJG76 está bajo el control del promotor del gen tetraciclina. Este gen de resistencia está ausente en este plasmidio híbrido, ya que limita en sus extremos con los sitios de restricción *AvaI* y *BamHI*, y fue reemplazado por el fragmento de P4 descrito anteriormente. El gen *psu* está bajo el control del promotor de tetraciclina lo cual resulta en la expresión del gen *psu* en niveles más altos que lo normal. Como se muestra en la Tabla XI, la actividad *psu* expresada por pJG76 induce una expresión significativa de  $\beta$ -galactosidasa, de alrededor de dos veces la producida por pP4vir1 *EcoRI*:AD-Km, y de un nivel similar al producido por este huésped que contiene el alelo defectivo *rho201* (ver Tabla X).

Estos resultados no descartan la posibilidad (poco probable) que *psu* pudiera estar actuando directamente para promover la expresión del

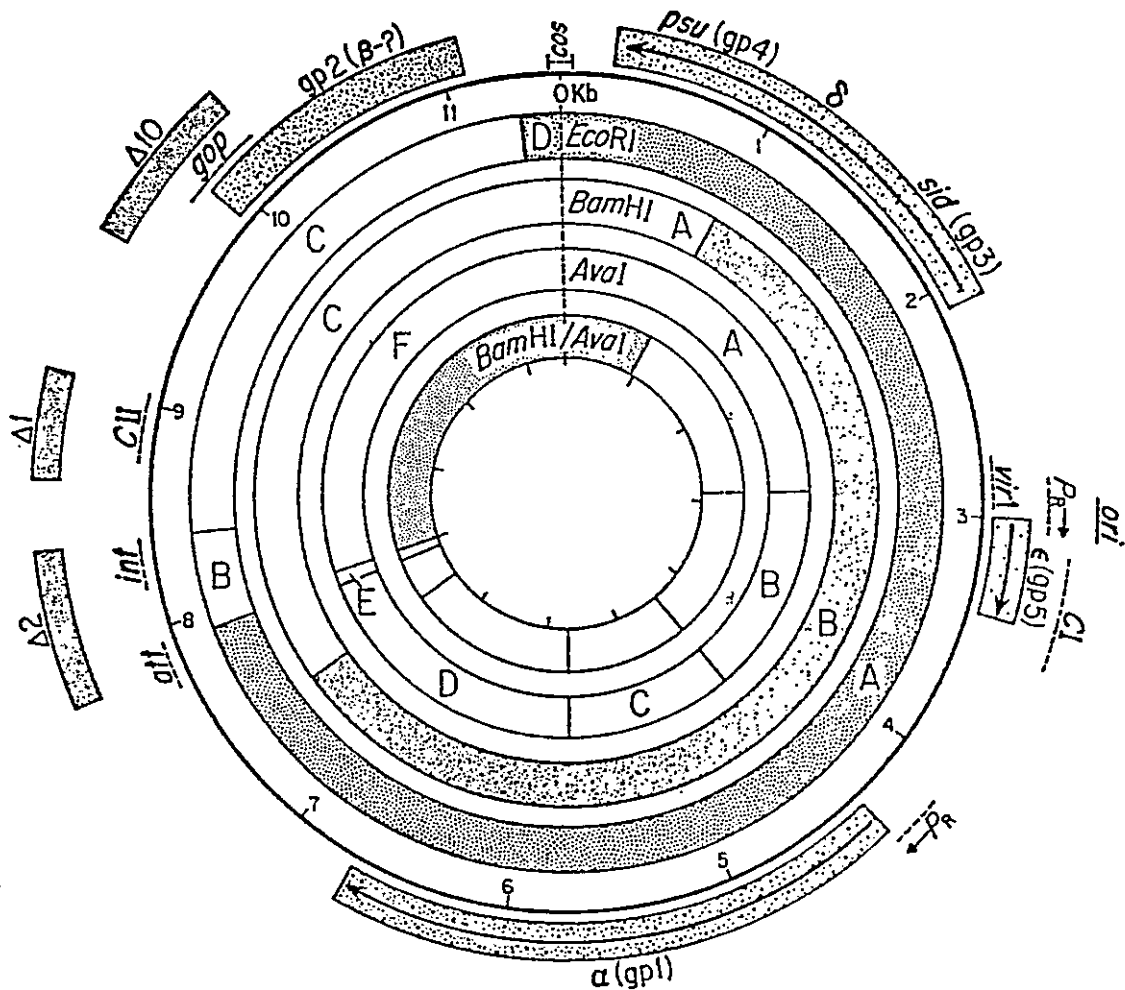


Figura 38. Mapa de restricción de pP4. En esta figura se presenta el mapa de restricción de *EcoRI*, *BamHI* y *AvaI* de P4. El fragmento achurado resultante de la doble digestión *AvaI* y *BamHI* en el círculo más interno corresponde al fragmento que se clonó en pBR325 en el lugar del gen estructural que confiere resistencia a tetraciclina. Se advierte que en este fragmento está presente el gen *psu*, y parte de los genes no esenciales de P4 que no están incluidos en las construcciones que llevan el fragmento *EcoRI*:AD.

TABLA XI

Medida de la  $\beta$ -galactosidasa como expresión del gen *psu* clonado en pBR325

Cepa	Unidades $\beta$ -gal
X8605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pBR325	6,5 $\pm$ 0,6
X8605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pJG76 (máxima atenuación)	163 $\pm$ 9
X8605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> pJG76 (mínima atenuación)	385 $\pm$ 25
X8605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> <i>trpR</i> <sup>+</sup> pJG76 (menos triptófano)	125 $\pm$ 13
X8605 <i>ilv</i> <sup>-</sup> <i>trpR</i> <sup>+</sup> pJG76 (mas triptófano)	13,9 $\pm$ 1,4

Los ensayos se realizaron como se describió en la leyenda de la Tabla XI. pJG76 se construyó clonando en pBR325 el fragmento achurado de P4 *Ava*I/*Ba*III que se muestra en la figura 38. En esta construcción, el gen estructural tetraciclina de pBR325 se ha sacado, y en su lugar se ha insertado el gen *psu* contenido en el fragmento *Ava*I/*Ba*III antes mencionado, quedando bajo el control del promotor de tetraciclina. La cepa que porta el plasmidio híbrido se creció en 30  $\mu$ g/ml de cloramfenicol. Se usó el medio LBG para crecer las células en condiciones de máxima atenuación. Se utilizó el medio mínimo glucosa, isoleucina, valina y un análogo del triptófano, el ácido 3- $\beta$ -indolacrílico para crecer las células en condiciones de mínima atenuación. La cepa *trpR*<sup>+</sup> se creció en medio mínimo glucosa, isoleucina, valina y en presencia (100  $\mu$ g/ml), o ausencia de triptófano.

operón de la lactosa, en vez de suprimir la terminación de la transcripción en el terminador del triptófano. Para demostrar que la lectura del transcripto es iniciada en el operón del triptófano, se hicieron estudios de atenuación usando un análogo del triptófano para lograr condiciones de mínima atenuación en ausencia de triptófano (R. Kolter, comunicación personal). Como se aprecia en la Tabla XI los niveles de  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de mínima atenuación (es decir en la óptima expresión del operón del triptófano de esta cepa constitutiva) son más del doble que en condiciones de máxima atenuación (células crecidas en presencia de triptófano). Aunque los resultados son indicativos que hay control de la actividad  $\beta$ -galactosidasa por el operón del triptófano, los cambios en actividad enzimática no son dramáticos. Para resolver en definitiva este punto, se construyó un derivado *trpR*<sup>+</sup> de la cepa X8605 *ilv*<sup>-</sup>*pJG76*, la que es constitutiva para el operón del triptófano (ver detalles en Materiales y Métodos). La expresión del operón del triptófano en esta cepa *trpR*<sup>+</sup> es ahora reprimida en presencia de triptófano, y por ende, si no hay terminación de la transcripción al final de este operón, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa se verá controlada por los niveles de triptófano. Como se aprecia en la Tabla XI, la expresión de  $\beta$ -galactosidasa se reduce alrededor de 10 veces en la cepa *trpR*<sup>+</sup> en presencia de triptófano, lo cual demuestra que hay lectura desde el operón del triptófano hacia el operon de la lactosa, y que ésta está gobernada desde el operón del triptófano.

## DISCUSION

Recientemente se demostró que una mutación espontánea, *vir1*, permite que P4 pueda propagarse como un plasmidio estable. Las condiciones en que pP4 es mantenido en forma estable, son diferentes a aquellas en que otros virus se propagan como plasmidios, como es el caso de lambda y P1 (Echols, 1971; Matsubara y Kayser, 1968; Scott, 1984). La razón de esto, es que P4 es dependiente de P2 (o fago relacionado) para su desarrollo lítico, en tanto que mutaciones virulentas de los fagos lambda y P1 producen la muerte del huésped, en vez de la mantención del fago como plasmidio. En contraste, una mutación espontánea hacia una forma virulenta del fago P4 produce la mantención de éste como un plasmidio, y no es letal para el huésped. La infección de las cepas que llevan el plasmidio con el fago P2 resulta en la producción de progenie del fago P4. Se establecieron nuevas líneas celulares portadoras de pP4, usando fago P4 "rescatado" después de estas infecciones. No se observaron diferencias en la frecuencia de aparición de líneas celulares que llevan el plasmidio estable, ni en el genoma de P4, descartándose la posibilidad de una nueva propiedad adquirida (mutación) necesaria para la propagación del plasmidio. La morfología de las colonias que llevaban pP4 estable, es indistinguible de la morfología de la cepa huésped, así como el tiempo de duplicación celular.

A continuación se discutirán los resultados de la caracterización de la propagación de pP4 en relación a otros plasmidios conocidos, y las ventajas que presenta el uso de este plasmidio como un vector de clonamiento.

*Propiedades básicas de pP4.*

El plasmidio de P4 mantenido en forma estable, presenta la inusual propiedad que su número de copias puede ser manipulado de acuerdo a las condiciones de crecimiento. Cuando las células que portan el plasmidio son crecidas en medio completo a 37°C, con glucosa y abundante oxigenación, el número de copias es alto (n=30-40). Si a este medio se le agregan sales hasta una concentración de un 1%, el número de copias se reduce a un estado intermedio (n=10-15). Finalmente, si las células son crecidas sin oxigenación, o sin glucosa, o a 30°C, se obtiene un número bajo de copias (n=1-3). Las causas de esta dependencia entre el número de copias y las condiciones de crecimiento no son claras, aunque alguno de estos efectos se han informado previamente. Una cepa que porta el plasmidio CoZE1 crecida en ausencia de glucosa (Clewell y Helinski, 1972), presenta sólo el 20% de las moléculas de plasmidio en la forma superenrollada, debido a la formación de un complejo de relajación DNA-proteína. Sin embargo, bajo condiciones similares para la cepa pP4, la hibridación que se muestra en la figura 7 no muestra una cantidad significativa de DNA del plasmidio: la cantidad de fragmento X1 (el fragmento de unión al cromosoma del huésped que contiene casi todo el fragmento AD) está presente en casi la misma cantidad que el fragmento AD (generado sólo por la forma libre del plasmidio). Este resultado implica que el efecto de glucosa sobre el número de copias de pP4 es a nivel de la replicación del DNA o su control, más que a un nivel topológico, como el caso de complejos de relajación encontrados en el plasmidio CoZE1.



La presencia de cAMP simula el efecto de falta de glucosa cuando ésta está presente, lo que indica que podría operar algún mecanismo similar al descrito para la represión catabólica. Si se piensa que cuando pP4 se replica en número alto de copias se asemeja al desarrollo lítico de un fago, y cuando lo hace en número bajo se simula un estado lisogénico, se produciría una situación análoga a la observada en lambda y P22, en los cuales cAMP induce una respuesta lisogénica. En estos casos, la evidencia sugiere que la iniciación de la síntesis del represor requiere cAMP y proteína CAP (Grodzicker et al., 1972; Hong et al., 1971). En ausencia de cAMP se produce una disminución en la lisogenización a través del sistema *hfIA* (Belfort y Wulff, 1974; Hoyt et al., 1982). En el caso de pP4 no se produce el ciclo lítico en ausencia de P2, y el estado desreprimido correspondería al de número alto de copias. Aunque no hay evidencia clara acerca de los mecanismos de control del número de copias de pP4, probablemente estos son a través de la interacción de un represor. Aparentemente, hay una respuesta mediada por cAMP, por tanto estudios con mutantes de la proteína CAP o de síntesis de cAMP, podrían arrojar luz acerca del papel que jugaría este efector.

También puede usarse variación en la temperatura de crecimiento celular para inducir el número bajo de copias (30°C). Esta parece ser una propiedad intrínseca de la replicación de P4 en ausencia de P2, ya que Kahn y Hanawalt (1978) describieron que el fago P4 replicaba pobremente su DNA a 30°C. Sin embargo, el hecho que exista una mutante (*δinv9*) cuyo número de copias no es afectado por las condiciones de crecimiento ni la presencia de cAMP, implicaría la existencia de un

control común de la replicación del plasmidio, que es independiente de las condiciones de crecimiento. Probablemente, en este mecanismo está envuelta la acción de un represor que está inactivo en esta mutante, o bien el sitio de unión de este represor putativo está alterado. Como *δinv9* es una mutante que además de no sintetizar los productos génicos *psu* y *sid* tiene una delección del fragmento B de  *EcoRI*, el cual contiene el gen *int* (ver figura 16), no es claro si la combinación de ambas mutaciones ó sólo una de ellas es responsable de la pérdida del control del número de copias por las condiciones de crecimiento.

La técnica empleada para la determinación del número de copias sólo es un promedio de copias de plasmidio por cromosoma equivalente, por lo cual no es posible saber si cada célula tiene 1-2 copias de plasmidio, ó, si un bajo porcentaje de las células tienen múltiples copias mientras que la mayoría no posee ninguna. Esto tampoco es posible determinarlo por los experimentos de explosión de P4 al superinfectar cepas que lleva pP4 en diferente número de copias con P2 (ver Tabla V), ya que aquí también se obtiene un promedio. Un modo directo de hacerlo podría ser por visualización en el microscopio electrónico.

La función de pP4 esencial para su replicación es la proteína  $\alpha$ , la que se ha postulado como una DNA primasa, la cual actuaría sobre la iniciación de la síntesis de DNA de P4 (Barrett et al., 1972; Gibbs et al., 1973; Barrett et al., 1983). Los estudios realizados con la mutante *αts61*, muestran que  $\alpha$  dirige la replicación de pP4, y que a 37°C la forma superenrollada es mantenida en forma estable. Después de cambiar el cultivo celular a 42°C (la temperatura no permisiva) durante



15 horas, no se detectan copias del plasmidio. Estudios preliminares indican que no hay un cese inmediato de la replicación de pF4 durante las primeras 2 horas (alrededor de 3-4 generaciones) después del cambio a la temperatura no permisiva. Algunas mutantes del tipo *dna* que son temperatura sensibles asociadas con procesos de iniciación presentan esta demora en la detención de la síntesis de DNA. Por ejemplo las mutantes *dnaA* y *dnaC* continúan con la síntesis de DNA cuando la temperatura es elevada al nivel no permisivo hasta que todos los cromosomas que se están replicando terminen su ciclo de replicación (Zyskind et al., 1977). En contraste, las mutantes *dnaG* (primasas) muestran una inhibición inmediata de la replicación después del cambio hacia la condición no permisiva (Louarn, 1974; Wechsler y Gross, 1971). Es por esto sorprendente ver esta demora en la inhibición de la replicación de pF4 $\alpha$ ts61vir1, ya que se cree que el producto del gen  $\alpha$  actúa como una primasa.

Los resultados de este estudio también demuestran que sólo una copia integrada de P4 es llevada en el cromosoma del huésped cuando C1a(pF4vir1 $\alpha$ ts61) es crecida a 42°C (ver figura 5). El estado de plasmidio es reinstaurado cuando estas células son crecidas a 37°C, que es la condición permisiva para la mutante *ts61*. El uso de esta mutante permitió demostrar que la replicación y mantención de pF4 es al menos parcialmente dependiente de funciones codificadas por pF4.

El hecho que pF4 se pueda integrar dentro del cromosoma y subsecuentemente ser generado desde el cromosoma a su forma libre (probablemente a través de replicación *in situ*), sugiere un parecido con

los plasmidios R1, R100.1 y su delección pLC1, un derivado inestable, cuya replicación está manejada por el cromosoma del huésped (Chandler et al., 1977). Al igual que R1 y R100.1, pF4 es capaz de replicarse autónomamente. Sin embargo, este último difiere en que puede mantenerse en número alto de copias, y se integra a través de un sitio att en vez de una secuencia IS. Es claramente diferente del derivado defectivo de R100.1, pLC1, porque pF4 es liberado del cromosoma bacteriano en la misma forma que entró, y después se replica autónomamente.

En cuanto a las funciones celulares requeridas para la replicación *in vivo* de pF4, los experimentos de inhibición con cloramfenicol muestran que se requiere de la síntesis de proteínas *de novo*, probablemente codificadas por pF4, a diferencia del plasmidio Co/E1 que no requiere proteínas codificadas por el plasmidio y que son estables en el tiempo, propiedad que permite su amplificación en relación al cromosoma bacteriano (Clewell, 1972). En general, la gran mayoría de los plasmidios usa la maquinaria de replicación del DNA del huésped en los procesos de elongación del DNA. Las diferencias en el comportamiento replicativo de los diferentes grupos de plasmidios casi siempre son reflejo de las diferencias en los procesos de iniciación y su regulación, manifestado en los diferentes requerimientos por síntesis de proteínas *de novo*.

El requerimiento transcripcional para la replicación de pF4 es un poco más difícil de interpretar, ya que los productos de RNA pueden servir como mensajeros para la síntesis de proteínas necesarias para la iniciación, o como moléculas partidoras necesarias para la iniciación de

la síntesis de DNA. Está descrito que  $\alpha$  codifica para una primasa putativa cuya actividad es resistente a rifampicina (Barrett et al., 1972). En la Tabla I se aprecia que el grado de inhibición de la síntesis de pP4 *in vivo* en presencia de rifampicina es menor en un factor de dos en relación al del cromosoma. Ambos hechos favorecen la idea que el requerimiento transcripcional para la replicación del plasmidio es más bien a nivel de un mensajero necesario para la síntesis de proteínas envueltas en la replicación de pP4.

El estudio hecho con las mutantes *dna ts* indicó que los requerimientos de pP4 por proteínas celulares son pocos. No requiere *dnaA*, B, y G, pero requiere de *dnaE*, que codifica para una de las subunidades de la DNA polimerasa III. Curiosamente, los productos celulares no requeridos para la replicación de pP4 participan en la iniciación de la replicación discontinua de DNA, en la hebra de movimiento retardado, mientras que la DNA polimerasa III participa en la replicación continua, en la hebra de movimiento dominante (Kornberg, 1984). Si se extrapolan los requerimientos a lo que es conocido para el fago, P4 no requiere *dnaC* (Bowden et al., 1976) que participa en el primosoma junto con los productos *dnaB*, G y las proteínas n (Arai et al., 1981), como tampoco de *polA* (Kahn y Hanawalt, 1979) que codifica para una subunidad de la DNA polimerasa I, ni de la proteína *rep* (Souza et al., 1977) que es una helicasa. Sin embargo, requiere de la proteína SSB para la replicación *in vitro* de la forma superenrollada del DNA de P4, (Krevolin et al., 1983) la cual se une a una hebra simple de DNA desestabilizando la doble hebra y permitiendo que la replicación del DNA

ocurra con mayor facilidad.

A pesar que pP4 no requiere de algunas funciones *dna*, tampoco complementa con éstas, como ha sido descrito para algunos plasmidios. Por ejemplo, los plasmidios del tipo I codifican para una DNA primasa (Lanka *et al.*, 1979), la cual es capaz de complementar con una mutante bacteriana *dnaG* (Wilkins *et al.*, 1981), permitiendo la replicación del cromosoma bacteriano a la temperatura no permisiva, con el consiguiente crecimiento celular. Asimismo, se han descrito casos de integración supresiva para mutantes *dnaA*, por los plasmidios R6K (Sotomura y Yoshikawa, 1975), P1 y P7 (Chesney y Scott, 1978), lo que permite crecimiento bacteriano a la temperatura no permisiva. También se han descrito casos intermedios, en que un plasmidio puede reemplazar la actividad defectiva por un corto periodo de tiempo, pero que no complementan, como pP4 con las mutaciones *dnaA* y *dnaG*. Es así como el plasmidio F suprime integrativamente la mutación *dnaA* durante una hora (Zeithen y Pato, 1971; Hiraga y Saitoh, 1973), pero no la complementa (Nishimura *et al.*, 1971).

El comportamiento de pP4 en cuanto a los requerimientos de funciones celulares es poco usual ya que éstos son muy pocos si se le compara con otros plasmidios (Scott, 1984).

#### *Uso de pP4 como un vector de clonamiento*

Un entendimiento de las propiedades básicas de pP4 es de importancia práctica para el uso de pP4 como un vector de clonamiento. Estas propiedades confieren a pP4 múltiples ventajas en su uso como un vector de clonamiento, las cuales serán enumeradas a continuación.

(i) P4 puede ser propagado como un bacteriófago con un ciclo lítico dependiente de otro colifago como es P2, como profago y como un plasmidio presente en número bajo o alto de copias. (ii) P4 posee un rango inusualmente amplio para su propagación como fago o plasmidio en bacterias gram-negativas como *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Serratia* y *E. coli* (Somerville y Kahn, 1983; Bertani y Bertani, 1970; Ow y Ausubel, 1980; Six y Klug, 1973). (iii) pP4 puede ser usado en el clonamiento de fragmentos de DNA que no son de P4, cubriendo un amplio rango de tamaños que son demasiado grandes para ser encapsidados por otro tipo de "fasmidios" vectores. La introducción de la mutación *sid* permite la selección y el clonamiento de fragmentos de hasta 27.000 pares de base de DNA, mientras se mantiene la capacidad de propagación de plasmidio y la capacidad de encapsidar este DNA en cápsides de fago. (iv) Una manipulación de las condiciones de crecimiento, como son el medio, la temperatura o aireación del huésped bacteriano, permite la elección de un número bajo de copias (1-3), intermedio (10-15) o alto (30-40). (v) El uso de un derivado *ots61* provee la capacidad de suprimir la mantención del plasmidio mientras se mantiene una copia integrada en el cromosoma bacteriano. Pueden usarse cambios de temperatura durante el crecimiento bacteriano para variar el modo de propagación desde plasmidio a integrado o viceversa. (vi) Debido a sus propiedades de número de copias inducible e integración, debería ser posible mediante la manipulación de la dosis génica o el estado libre de plasmidio *versus* el integrado, clonar genes cuyos productos son letales para el huésped. (vii) Su versatilidad como "fasmidio" permite una alta eficiencia de



infección como fago vector, con la subsecuente mantención como plasmidio o profago. Las copias del plasmidio son fácilmente encapsidadas en partículas de fago viables después de una superinfección con P2. Por otro lado, también es posible la encapsidación *in vitro* de P4 (Pruss et al., 1974; Pruss et al., 1975), lo cual permite la encapsidación directa de P4 que lleva DNA foráneo insertado en él. (viii) Existe una prueba (patch-test) la cual permite la visualización directa de células que llevan pP4. Alternativamente, se pueden seleccionar derivados de P4 que llevan genes de resistencia a antibióticos, tales como ampicilina, tetraciclina, kanamicina (Lagos et al., 1985; Jiang y Goldstein, manuscrito en preparación; Kim, Lagos y Goldstein, resultados no publicados). (ix) Los sitios de inserción pueden ser escogidos basándose en los numerosos patrones de enzimas de restricción conocidos (ver figura 24). Esta información se ha usado para el clonamiento en P4 de pequeños fragmentos de DNA como por ejemplo aquellos envueltos en la fijación de nitrógeno en *Klebsiella* (Dw y Ausubel, 1980; 1983), y más recientemente en el clonamiento de fragmentos más grandes de DNA humano elegidos al azar, los cuales son llevados en forma estable, como fago, o como plasmidio (Kurnit et al., 1985). En este último caso, utilizándose la información disponible de la caracterización de pP4, se usó la mutante *sid1* del "fasmidio" P4, lo cual permitió la replicación y encapsidación de fragmentos de DNA de hasta 25.000 pares de bases. Estos recombinantes se propagaron en una cepa de *E. coli* deficiente en la función *recA* como un fago virulento en presencia de P2, o como un plasmidio cuyo número de copias es inducible en ausencia de P2. Se usó

el ensayo para detectar secuencias homólogas basado en el sistema de recombinación "piVX" para seleccionar los vectores P4*sid1* que llevaban inserciones de DNA humano.

#### *Funciones de P4 que afectan la mantención del plasmidio*

El análisis de P4, usando mutantes con deleciones sugiere que el genoma de P4 puede dividirse en dos partes, de las cuales sólo una es esencial para el desarrollo lítico de P4 en presencia de F2 (Souza et al., 1978). Las mutaciones *δ*, *sid* y *psu* que se sabe afectan el crecimiento lítico de P4, no afectan el establecimiento y mantención de pP4 propagado en número alto de copias (ver Tabla III).

Como se expuso en Resultados, la función *int*, necesaria para la integración de pP4 en el cromosoma bacteriano es un requerimiento para la estabilidad de pP4. El mecanismo de partición sería mediante una "copia maestra" en el cromosoma bacteriano, la cual independiente de la distribución del plasmidio libre al momento de la división celular, producirá una partición pasiva junto con el cromosoma en las células hijas. Probablemente, cuando es necesario, esta copia será replicada *in situ* para restablecer la forma de plasmidio libre. Se descarta un mecanismo de excisión, ya que en éste se perdería la copia integrada, que es la que confiere estabilidad al plasmidio, la que debería nuevamente reintegrarse, lo que no ocurre un 100% de las veces en una infección con P4. Este mecanismo de estabilidad sería diferente que el descrito para otros plasmidios, ya que en general la mantención estable de un plasmidio en células en crecimiento requiere una velocidad de

replicación compatible con la constante de crecimiento celular. Esto se realizaría mediante la acción de algunos agentes citoplasmáticos, los cuales regularían la frecuencia de iniciación de la replicación del plasmidio (Pritchard *et al.*, 1968). Esta regulación mantendría la concentración de plasmidio constante en relación a la masa celular. La mantención estable del plasmidio también requiere que las células hijas después de la división celular reciban al menos una copia del replicón proveniente de la célula parental. La falta de un mecanismo de partición exacto llevaría a la eventual pérdida del plasmidio debido a eventos puramente probabilísticos.

El mecanismo de partición descrito para el plasmidio pSC101 (Meacock y Cohen, 1980), depende del locus *par* de acción en *cis*, cuya función es análoga a la del centrómero en eucariontes. Un mecanismo similar ha sido descrito para un miniplasmidio derivado de P1 (Austin y Abels, 1983), el cual requiere además de la acción de una proteína. Para el caso de un derivado del plasmido F también se requiere de un *locus* que actúa en *cis* (Druga e Hiraga, 1983) pero además se requieren dos proteínas que participarían en un probable anclaje de esta región del DNA a la membrana. También pueden participar funciones celulares en la estabilidad de plasmidios, como se ha descrito para *ColE1*, en que se requiere de las exonucleasa I, III y V (Bassett y Kushner, 1984). El mecanismo de partición de pF4 a través de una "copia maestra" sería único, y también requiere de un *locus* que actúa en *cis* (el sitio *att*) necesario para la integración de pF4 dentro del cromosoma bacteriano.

El control inducible del número de copias de pF4 también está bajo



el control genético de P4. La mutante  $\delta inv9$  que ha perdido este control está afectada en su gen *int* (ausente por la deleción del fragmento B de *EcoRI*), y en la región *sid- $\delta$ -psu*, lo cual le confiere un genotipo *sid*<sup>-</sup>, *psu*<sup>-</sup>. Parece haber una interacción entre ambas mutaciones, ya que es imposible lograr integración de P4 que lleva una deleción del gen *int*, a no ser el caso específico en que P4 lleve la doble mutación *psu*<sup>-</sup>, *sid*<sup>-</sup>. Por otra parte, cuando se utiliza la doble mutante  $\delta inv11$ , que también es *psu*<sup>-</sup>, *sid*<sup>-</sup>, pero que es *int*<sup>+</sup>, no hay pérdida del control de número de copias por las condiciones de crecimiento. Si no existe relación entre estas dos regiones significa que el lugar donde se produce la inversión del fragmento B de *HindIII* es crítico en el control de número de copias de pP4.

El estudio del control del número de copias de una gran variedad de plasmidios han verificado la predicción hecha por Fritchard et al. (1968), en cuanto a que la replicación de los plasmidios está controlada por un circuito de retroalimentación negativa. Se han encontrado dos variantes de este control negativo: en uno de ellos, actúa un inhibidor que es difusible y está codificado por el plasmidio, el cual limita la velocidad de replicación al unirse a un sitio específico en el plasmidio. El mecanismo por el cual el inhibidor se une al sitio de unión para limitar la replicación, varía entre plasmidio y plasmidio, lo cual tiene importancia en los comportamientos de incompatibilidad. En la otra variante, el plasmidio posee uno o más sitios a los cuales se une un producto génico del plasmidio (el iniciador) el cual es requerido para la iniciación, y esta unión tiene una función regulatoria negativa

en la determinación de la velocidad de replicación.

Para el caso de pP4 es más factible pensar en un mecanismo de regulación en el cual está envuelto un represor, y un sitio de unión del represor, ya que esto se asemeja a la regulación de la replicación descrita para otros fagos, como es lambda. En este sistema habría un control negativo por parte del represor  $cI$  y la proteína  $cro$ , y un control positivo por parte del gen  $\theta$  y la proteína  $F$  (Ptashne et al., 1980; Johnson et al., 1981).

Finalmente, el hecho que la mutante  $\epsilon$  que no pueda ser mantenida en forma estable como plasmidio, no sería debido a la mutación en el gen  $\epsilon$ , sino al carácter polar de ésta, ya que dicho efecto es suprimido en un huésped  $\rho$  defectivo. Este fenómeno es bastante complejo, pues se sabe que esta mutante produce las proteínas  $\alpha$ ,  $psu$  y  $sid$  (Geisselsoder et al., 1982). El gen  $\alpha$  (el cual tiene su propio promotor) está distal a la mutación ámbar en  $\epsilon$ , y no habría un efecto polar sobre él, al menos después de la infección viral. Pudiese ser que en el estado de plasmidio se produjese una inactivación de este promotor, y que la transcripción se iniciase en el promotor de  $\epsilon$ . En este promotor o cercano a él mapea la mutación  $vir1$  que es una mutación promotor-up, indispensable para la mantención del plasmidio. Existiría además una relación entre el gen  $\epsilon$  y la producción de las proteínas  $sid$  y  $psu$ , ya que los experimentos hechos en la cepa huésped  $\rho$  defectiva ( $\rho h o 102$ ) usando la mutante  $\epsilon$ , sugieren que estas proteínas no son producidas en el estado de plasmidio.

#### *Expresión génica del plasmidio P4.*

Mediante análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se determinó que el fago P4 expresa alrededor de 8 proteínas después de infectar al huésped en ausencia del fago P2 (Barrett et al., 1976; Geisselsoder et al., 1981). Mediante el uso de mutantes se ha determinado que cuatro de estas proteínas son los productos de los genes  $\alpha$ , 2, *sid* y *psu*. Después de la infección viral se producen niveles altos de estas proteínas y la cinética de aparición se ha descrito por Lee y Goldstein (1985). La proteína *psu* parece regular a la proteína  $\alpha$ . A la proteína 2 no se le conoce un rol en el desarrollo lítico de P4, expresándose ésta en forma constitutiva.

La idea de hacer un estudio similar al hecho en fago usando el sistema de plasmidio, se basó fundamentalmente en la observación que el plasmidio de P4 no interfería con el desarrollo lítico de P2. El fenómeno de interferencia fue descrito por Geisselsoder et al. (1978), quienes demostraron que la mutante *sid* no interfería con el desarrollo lítico de P2. El resultado obtenido mediante el análisis de geles, muestra que pP4 produce niveles bajos de *sid*, y que los niveles de *psu* y  $\alpha$  son indetectables, mientras que la proteína 2 es producida en cantidad comparable a la observada después de la infección viral. Este resultado no daría cuenta de la pérdida de la capacidad de interferencia que tiene pP4, ya que aunque en niveles discretos, la proteína *sid* se produce. Una explicación a este fenómeno es que la mutación *sid* tiene un efecto polar sobre la proteína *psu* y es ésta, y no *sid*, la responsable de la interferencia. Hasta el momento, la única mutante *sid* que existe es

ámbar, y ésta parece tener un efecto polar en *psu*, ya sea cuando se mide la proteína *psu* después de una infección usando la mutante *sid*, o cuando se mide la capacidad de suprimir polaridad sobre mutaciones ámbar en operones policistrónicos de P2. La proteína  $\alpha$  por sí misma no interfiere con el desarrollo lítico de P2, ya que la mutante *sid* la produce en cantidades altas. Esta hipótesis se ve apoyada por datos de secuencia de DNA de la región *sid- $\delta$ -psu*, (Lin y Six, comunicación personal) en que los genes son transcritos en este orden. Además, existiría preferencia por la producción de un sólo transcripto que contendría estos tres genes, a pesar que existe una región identificada como posible promotor del gen *psu* (Christie y Calendar, comunicación personal).

De estos resultados es claro que la expresión génica de pF4 es diferente a la observada en el fago. Acerca de la expresión en forma constitutiva de la proteína 2 es difícil especular, ya que no se le conoce función alguna, salvo que copurifica con la RNA polimerasa del huésped (Lindqvist, comunicación personal). Los niveles de expresión bajos que hacen indetectable la presencia de la proteína  $\alpha$  podrían deberse a un efecto pleiotrópico de la proteína *psu*, ya que se sabe que esta proteína modula positivamente a  $\alpha$  (Lee y Goldstein, 1985), por lo tanto la ausencia de *psu* resultaría en niveles bajísimos de  $\alpha$ . La proteína  $\alpha$  está presente en cantidades catalíticas, ya que mediante el uso de la mutante termosensible *ats61* se comprobó que  $\alpha$  era indispensable para la replicación del plásmido.

Una explicación del porqué la proteína *psu* estaría ausente o presente en cantidades bajísimas, sería que éste es un mecanismo de adaptación de



pP4. Como se describió en Resultados, *psu* es un antiterminador de la transcripción que antagoniza con el factor de terminación rho. Células que son defectivas en rho presentan filamentación y en general un fenotipo bastante enfermo que se traduce en un crecimiento pobre. Las mutantes rho son parcialmente defectivas o termosensibles, ya que la carencia total de esta actividad es letal para la célula. La presencia de cantidades altas de *psu* es perniciosa para la célula (como es el caso del huésped que lleva al plasmidio pJG79, en que el tiempo de duplicación celular ha aumentado considerablemente), las cuales adquieren un fenotipo enfermo. El control de la síntesis de esta proteína permitiría que la célula tolerara la presencia de pP4 sin mayores trastornos. Cuando pP4 es mantenido en forma estable (sin presión selectiva), el fenotipo celular no difiere de aquel de la cepa parental que no lleva el plasmidio. El mecanismo por el cual se controlaría la síntesis de esta proteína es desconocido, aunque en la región correspondiente al gen  $\delta$  que es previa al gen *psu*, hay ocho díadas de simetría, que podrían corresponder a terminadores de la transcripción (Lungquist, Spadaro y Goldstein, resultados no publicados).

Esto hacía indispensable un estudio mas profundo acerca de la proteína *psu*, la cual juega un papel importante en la regulación de P4. El desarrollo del sistema de plasmidio pP4 permitió la identificación de la proteína *psu* como un antiterminador de la transcripción.

*Identificación de un antiterminador codificado por P4 que antagoniza con la terminación de la transcripción mediada por rho.*

La capacidad de P4 de propagarse como un plasmidio permitió determinar la actividad antiterminadora del gen *psu*. La evidencia presentada en los Resultados apoyaría un modelo en que la actividad antiterminadora de *psu* es debida a un efecto antagónico sobre la proteína rho. Consistente con esta hipótesis, es la observación que P4 no puede ser establecido como plasmidio en un huésped que contiene una proteína rho parcialmente defectiva (alelo 102). Cuando esta cepa es infectada con P4 se observa un efecto letal sobre un 99% de las células, y ninguna de las sobrevivientes lleva pP4. Debido a que un fenotipo rho totalmente defectivo es letal para *E. coli* (Das et al., 1976; Inoko et al., 1977), podría especularse que el efecto letal observado en la cepa rho102 infectada con P4, es un efecto sinérgico entre *psu* y la proteína rho defectiva. El hecho que la mutante  $\delta inv11$ , que no produce las proteínas sid y *psu*, pueda ser establecida como plasmidio en esta cepa presta apoyo a esta explicación.

Los resultados presentados anteriormente no hacen distinción entre modelos con mecanismos de acción antagónica directa o indirecta del producto génico *psu* y el factor rho. Entre las posibilidades están que *psu* compita directamente con rho por un sitio de unión a la RNA polimerasa, o que inactive a la proteína rho, o que compita por el sitio de terminación en el DNA, o que indirectamente antagonice con la actividad de rho controlando su expresión génica. Tampoco se sabe si *psu* puede actuar como antiterminador de la transcripción en sitios terminadores rho-independientes.

La proteína *psu* actúa alterando los patrones de terminación de la transcripción en tres genomas que son esencialmente heterólogos: en P4 (Lee y Goldstein, 1985); en el fago temperado P2 (Sunshine *et al.*, 1976; Sauer *et al.*, 1981); y en el cromosoma bacteriano (Lagos *et al.*, 1985). La proteína antiterminadora más estudiada hasta el momento ha sido la proteína N de lambda. La proteína antiterminadora N está limitada en su especificidad debido a la dependencia de la presencia de un sitio *nut*, que se encuentran en el genoma de lambda (Greenblatt, 1981), o un sitio equivalente a *nut* ubicado en el operón *rpoU-dnaG-rpoD* del cromosoma bacteriano (Nakamura y Yura, 1976). En el caso de *psu* no es posible discernir si la acción de esta proteína necesita de una secuencia de reconocimiento análoga, pero diferente del sitio *nut* requerido para la actividad de N.

A pesar de las diferencias en la especificidad de los operones hay fuertes similitudes en las funciones de *psu* y N, y podría ser sugerente de un mecanismo común, usado por elementos extracromosómicos, para modular la expresión de familias de genes no ligados. Ambas proteínas afectan positivamente la expresión de DNA primasas (reiniciación de la síntesis de la proteína  $\alpha$  por *psu*, y niveles altos de expresión del gen *dnaG* del huésped por la proteína N). Un huésped de *E. coli* que contiene un alelo defectivo para *rho* suprimirá el efecto de mutaciones en el gen N (Brunel y Davison, 1975; Richardson *et al.*, 1977) y el de mutaciones en P4 (Sunshine *et al.*, 1976; Sauer *et al.*, 1981), a pesar de las diferencias aparentes en los operones regulados por N y *psu*. Sería de gran interés determinar si se requiere de un sitio análogo a *nut* para

mediar la acción de *psu* sobre *rho*. El descubrimiento de un nuevo antiterminador abre nuevas posibilidades en el estudio de la terminación de la transcripción, el que podría ser similar al papel que juega la proteína N en el estudio de los factores del huésped *nusA*, *nusB* y *nusC* y las proteínas ribosomales S10 y L11.

#### *Comentario final*

La caracterización del plasmidio P4 ha permitido comprender la función de algunos de sus productos génicos sobre la propagación de pP4.

Así, se encontró que el producto del gen *psu* actúa como un antiterminador de la transcripción no sólo sobre P2 y P4, sino también sobre un operón bacteriano. La expresión de *psu* está regulada en pP4, ya que este gen no se expresa en el estado de plasmidio. La acción de *psu* estaría mediada por el factor *rho*.

El producto del gen  $\alpha$  es esencial en la replicación de pP4, pero es dispensable cuando P4 está integrado al cromosoma bacteriano.

El producto del gen *int* le confiere estabilidad a pP4, mediante la integración de P4 al cromosoma bacteriano.

El control del número de copias de pP4 sería a través de la interacción entre los genes, o productos génicos *int*,  $\delta$ , *psu* y *sid*.

La capacidad de P4 de oscilar entre fago y plasmidio, y la propiedad de este último de propagarse en número de copias alto, intermedio, o bajo, confieren ventajas al uso de pP4 como vector de clonamiento.



## BIBLIOGRAFIA

- Arai, K., R. Low, J. Kobori, J. Shlomai y A. Kornberg. 1981. Mechanism of *dnaB* protein action. V. Association of *dnaB* protein, protein  $n'$  and other prepriming proteins in the primosome of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 256:5273-5280.
- Austin, S. y A. Abeles. 1983. Partition of unit-copy miniplasmid to daughter cells. II. The partition region of miniplasmid P1 encodes an essential protein and a centromere-like site at which it acts. *J. Mol. Biol.* 169:373-387.
- Barrett, K. J., A. Blinkova y G. Arnold. 1983. The bacteriophage P4  $\alpha$  gene is the structural gene for bacteriophage P4-induced RNA polymerase. *J. Virol.* 48:157-169.
- Barrett, K. J., W. Gibbs, y R. Calendar. 1972. A transcribing activity induced by satellite phage P4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:2986-2990.
- Barrett, K. J., M. Marsh y R. Calendar. 1976. Interactions between a satellite bacteriophage and its helper. *J. Mol. Biol.* 106:683-707.
- Basset, C. y S. Kushner. 1984. Exonucleases I, III, and V are required for stability of ColE1-related plasmids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 157:661-664.
- Beckwith, J. 1963. Restoration of operon activity by suppressors. *Biochim. Biophys. Acta* 76:162-164.
- Belfort, M. y D. Wulff. 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. U.S.A.* 71:779-782.
- Berman, M., L. Enquist y T. Silhavy. 1981. Advances in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Bertani, L. E. 1957. The effect of the inhibition of protein synthesis on the establishment of lysogeny. *Virology* 4:53-71.
- Bertani, E. y G. Bertani. 1970. Preparation and characterization of temperate, non inducible bacteriophage P2. *J. Gen. Virol.* 6:201-212.
- Bertani, G., E. Ljungquist, K. Jaqusztyn-Krynicka y S. Jupp. 1978. Defective particle assembly in wild type P2 bacteriophage and its correction by the *Ig* mutation. *J. Gen. Virol.* 38:251-261.
- Bertani, G. y J. Weigle. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* 65:113-121.

- Bowden, D. W., R. S. Twersky y R. Calendar. 1975. *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid synthesis mutants: their effect upon bacteriophage P2 and satellite bacteriophage P4 deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.* 124:167-175.
- Brunel, F. y J. Davison. 1975. Bacterial mutants able to partly suppress the effect of *N* mutation in bacteriophage lambda. *Mol. Gen. Genet.* 136:167-180.
- Calendar, R., E. Ljungquist, G. Deho, D. Usher, R. Goldstein, P. Youdarian, G. Sironi y E. Six. 1981. Lysogenization by satellite phage P4. *Virology* 113:20-38.
- Chandler, M., L. Silver, J. Frey y L. Caro. 1977. Suppression of an *Escherichia coli* *dnaA* mutation by the integrated R factor R100.1: generation of small plasmids after integration. *J. Bacteriol.* 130:303-311.
- Chesney, R. y J. Scott. 1978. Suppression of *Escherichia coli* *dnaA* (Ts) by bacteriophage P1 and P7. En *Microbiology-1978*, D. Schlesinger ed., American Society for Microbiology, Washington D.C., pp 68-70.
- Clewell, D. 1972. Nature of *ColE1* plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.* 110:667-676.
- Clewell, D. B. y D. Helinski. 1972. Effect of growth conditions on the formation of the relaxation complex of supercoiled *ColE1* deoxyribonucleic acid and protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 110:1135-1146.
- Das, A., D. Court, y S. Adhya. 1976. Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *E. coli* defective in transcription termination factor rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:1959-1963.
- Davis, R., D. Botstein y J. Roth. 1980. *Advances Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Deho, G., D. Ghisotti, P. Alano, S. Zangrossi, M. G Borrello y G. Sironi. 1984. Plasmid mode of propagation of the genetic element P4. *J. Mol. Biol.* 178:191-207.
- Diana, C., G. Deho, J. Geisselsoder, L. Tinelli y R. Goldstein. 1978. Viral interference at the level of capsid size determination by satellite phage P4. *J. Mol. Biol.* 126:433-445.
- Dumas, L. y C. Miller. 1973. Replication of bacteriophage phiX174 DNA in a temperature-sensitive *dnaE* mutant of *Escherichia coli* C. *J. Virol.* 11:848-855.

- Echols, H. 1971. Regulation of lytic development. pp. 247-270. En A. D. Hershey (ed.), *The bacteriophage lambda*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Ely, S. y Staudenbauer. 1981. Regulation of plasmid DNA synthesis: isolation and characterization of copy number mutants of mini R6-5 and mini F plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 181:29-35.
- Geisselsoder, J., M. Chibandaram y R. Goldstein. 1978. Transcriptional control of capsid size in the P2:P4 system. *J. Mol. Biol.* 126:447-456.
- Geisselsoder, J., J. Sedivy, D. Walsh y R. Goldstein. 1982. Capsid structure of satellite phage P4 and its P2 helper. *J. Ultrastruct. Res.* 79:165-173.
- Gibbs, W., R. Goldstein, R. Weiner, B. Lindqvist y R. Calendar. 1973. Satellite bacteriophage P4: characterization of mutants in two essential genes. *Virology* 53:24-39.
- Goldstein, L., M. Thomas y R. Davis. 1975. *EcoRI* endonuclease cleavage map of bacteriophage P4 DNA. *Virology* 66:420-427.
- Goldstein, R., J. Legnyel, G. Pruss, K. Barrett, R. Calendar y E. Six. 1974. Head size determination and the morphogenesis of satellite phage P4. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 68:59-75.
- Goldstein, R., J. Sedivy y E. Ljungquist. 1982. Propagation of satellite phage P4 as a plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:515-519.
- Greenblatt, J. 1981. Regulation of transcription termination by the N gene protein of bacteriophage lambda. *Cell* 24:8-9.
- Grodzicker, T., R. Arditti y H. Einsen. 1972. Establishment of repression by lambdaoid phage in catabolite activator protein and adenylate cyclase mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:366-370.
- Guarente, L. y J. Beckwith. 1978. Mutant RNA polymerase of *Escherichia coli* terminates transcription in strains making defective rho factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:294-297.
- Guarente, L., D. Mitchell y J. Beckwith. 1977. Transcription termination at the end of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 112:423-436.
- Hiraga, S. y T. Saitoh. 1973. Initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. II. Effect of rifampicin on the resumption of replication of episome and chromosome upon the returning of *dna* mutants from a non-permissive to a permissive temperature. *Mol. Gen. Genet.* 137:239-248.

- Hong, J-S., G. Smith y B. Ames. 1971. Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate concentration in the bacterial host regulates the viral the viral decision between lysogeny and lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:2258-2262.
- Hoyt, M. A., D. Knight, A. Das. H. Miller y H. Echols. 1982. Control of phage lambda development by stability and synthesis of cII protein: role of the viral cIII and host *hfIA*, *hiA* and *hiD* genes. *Cell* 31:565-573.
- Inman, R., M. Schnos, L. Simon, E. Six y D. Walker. 1971. Some morphological properties of P4 bacteriophage and P4 DNA. *Virology* 44:67-72.
- Inoko, H., K. Shigesada y M. Imai. 1977. Isolation and characterization of conditional lethal rho mutants of *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:1162-1166.
- Johnson, A., A. Poteete, G. Lauer, R. Sauer, G. Ackers y M. Ptashne. 1981. Lambda repressor and *cro*: Components of an efficient molecular switch. *Nature* 294:217-223.
- Kahn, M. y P. Hanawalt. 1978. Size distribution of DNA replicative intermediates in bacteriophage P4 and in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 128:501-526.
- Kahn, M. y D. Helinski. 1978. Construction of a novel plasmid-phage hybrid. use of the hybrid to demonstrate *ColE1* replication *in vivo* in the absence of a *ColE1* specified protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:2200-2204.
- Kahn, M. y Hopkins. 1978. Restriction endonuclease cleavage map of bacteriophage P4 DNA. *Virology* 85:359-363.
- Kahn, M., D. Dw, B. Sauer, R. Rabinowitz y R. Calendar. 1980. genetic analyses of bacteriophage P4 using P4-phasmid *ColE1* hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 177:399-412.
- Korn, L. y C. Yanofsky. 1976. Polarity suppressors defective in transcription termination at the attenuator of the tryptophan operon in *E. coli* have altered rho factor. *J. Mol. Biol.* 106:231-241.
- Krevolin, M., D. Roof, M. Kahn, C. Corless, J. Young y R. Calendar. 1983. Satellite bacteriophage P4: Initiation of DNA replication *in vivo* and *in vitro*. En *Microbiology-1983*, D. Schelesinger, ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp100-103.
- Kornberg, A. 1982. 1982 supplement to DNA replication, W.H. Freeman and Co., San Francisco.



- Kornberg, A. 1984. DNA replication. *Trends Biochem. Sci.* 9:122-124.
- Kurnit, D., R. Neve, F. Lee, R. Lagos y R. Goldstein. 1985. Dosage-dependent suppression of an amber mutation: Alternate capsid sizes for phasmid P4. Enviado a *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-689.
- Lagos, R. y R. Goldstein. 1984. Phasmid P4: Manipulation of plasmid copy number and induction from the integrated state. *J. Bacteriol.* 158:208-215.
- Lagos, R. J. Beckwith y R. Goldstein. 1985. A phage gene product which antagonizes rho-dependent transcription termination of a bacterial operon. Enviado a publicación.
- Lanka, E., E. Scherzinger, E. Gunther y H. Schuster. 1979. A DNA primase specified by I-like plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:3632-3636.
- Lee, S-J. 1981. Altered patterns of gene expression by satellite P4 mutants unable to regulate their P2 helper. Tesis Harvard College.
- Lee, S-J., y R. Goldstein. 1985. A novel role for transcription antitermination in the reinitiation of DNA replication by satellite bacteriophage P4. Enviado a publicación.
- Legnyel, J., R. Goldstein, M. Marsh, M. Sunshine y R. Calendar. 1973. Bacteriophage P2 head morphogenesis: Cleavage of the major capsid protein. *Virology* 53:1-23.
- Legnyel, J., R. Goldstein, M. Marsh y R. Calendar. Structure of the bacteriophage P2 tail. *Virology* 62:161-174.
- Lindhal, G. 1971. On the control of transcription in bacteriophage P2. *Virology* 46:620-633.
- Lindqvist, B. 1971. Expression of phage transcription in P2 lysogens infected with helper-dependent coliphage P4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:2753-2755.
- Lindqvist, B. 1974. Expression of phage transcription in P2 lysogens infected with helper dependent coliphage P4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:2752-2755.
- Lindqvist, B. y E. Six. 1971. Replication of P4 DNA in a nonlysogenic host. *Virology* 43:1-7.
- Lindqvist, B., S. Valla y E. Six. 1978. Control of gene activation of P2

- prophage by satellite phage P4. *Virology* 87:231-238.
- Louarn, J. 1974. Size distribution and molecular polarity of nascent DNA in a temperature sensitive *dnaG* mutant of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 133:193-200.
- Maniatis, T., E. Fritsch y J. Sambrook. 1982. Molecular cloning (a laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Matsubara, K., y D. Kaiser. 1968. Lambda *dv*: an autonomously replicating DNA fragment. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33:769-775.
- Mc Henry, C. y A. Kornberg. 1977. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252:6478-6484.
- Meacock, P. y S. Cohen. Partitioning of bacterial plasmids during cell division: A *cis*-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell* 20:529-542.
- Miller, J. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Nakamura, Y. y T. Yura. 1976. Induction of sigma factor synthesis in *Escherichia coli* by the N gene product of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:4405-4409.
- Nishimura, Y., L. Caro, C. Berg y Y. Hirota. 1971. Chromosome replication in *Escherichia coli*. IV. Control of chromosome replication and cell division by an integrated episome. *J. Mol. Biol.* 55:441-456.
- Ogura, T. y S. Hiraga. 1983. Partition mechanism of F plasmid: Two plasmid gene-encoded products and a *cis*-acting region are involved in partition. *Cell* 32:351-360.
- Oka, A., H. Sugisaki y M. Takanami. 1981. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J. Mol. Biol.* 146:217-226.
- Ow, D. y F. Ausubel. 1980. Recombinant P4 bacteriophage propagate as viable lytic phages or as autonomous plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 180:165-175.
- Ow, D. y F. Ausubel. 1983. Conditionally replicating plasmid vectors that can integrate into the *Klebsiella pneumoniae* chromosome via bacteriophage P4 site-specific recombination. *J. Bacteriol.* 155:704-703.
- Pritchard, R., P. Barth y J. Collins. 1969. Control of DNA synthesis in bacteria. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 19:263-297.
- Pruss, G., R. Goldstein y R. Calendar. 1974. *In vitro* packaging of

- satellite phage P4 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:2367-2371.
- Pruss, G., J. Wang y R. Calendar. 1975. *In vitro* packaging of closed circular monomers of bacteriophage DNA. *J. Mol. Biol.* 98:465-478.
- Ptashne, M., A. Jeffrey, A. Johnson, R. Maurer, B. Meyer, C. Fabo, T. Roberts y R. Sauer. 1980. How the lambda repressor and cro work. *Cell* 19:1-11.
- Reznikoff, W., J. Miller, J. Scaife y J. Beckwith. 1969. A mechanism for repressor action. *J. Mol. Biol.* 43:201-213.
- Richardson, J., P. Fink, K. Blanchard y M. Macy. 1977. Bacteria with defective rho factors suppress the effects of N mutations in bacteriophage lambda. *Mol. Gen. Genet.* 153:81-85.
- Roberts, J.W. 1969. Termination factor for RNA synthesis. *Nature* 224:1168-1175.
- Rowen, L. y A. Konberg. 1978. Primase, the dnaG protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253:758-764.
- Sancar, A., A. Hack y D. Rupp. 1979. Simple method for identification of plamid-coded proteins. *J. Bacteriol.* 137:692.
- Sasaki, I. y G. Bertani. 1965. Growth abnormalities in Hfr derivatives of *E. coli* C. *J. Gen. Microbiol.* 40:365-376.
- Sauer, B., D. Dw, L. Ling y R. Calendar. 1981. Mutants of satellite phage P4 which are defective in the suppression of transcriptional polarity. *J. Mol. Biol.* 145:29-46.
- Scott, J. 1984. Regulation of plasmid replication. *Microbiol. Rev.* 48:1-23.
- Shore, D., G. Deho, J. Tsipis y R. Goldstein. 1978. Determination of capsid size by satellite bacteriophage P4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:400-404.
- Sironi, G. 1969. Mutants of *Escherichia coli* unable to be lysogenized by the temperate bacteriophage P2. *Virology* 37:163-176.
- Six, E. 1975. The helper dependence of satellite bacteriophage P4: which gene functions of bacteriophage P2 are needed by P4? *Virology* 67:249-263.
- Six, E. y C. C. Klug. 1973. Bacteriophage P4: a satellite virus depending on a helper such as prophage P2. *Virology* 65:327-344.
- Six, E. y B. Lindqvist. 1971. Multiplication of bacteriophage P4 in the



- absence of replication of the DNA of its helper. *Virology* 41:8-15.
- Six, E. y B. Lindqvist. 1978. Mutual derepression in the P2-P4 bacteriophage system. *Virology* 81:81-91.
- Somerville, J. y M. Kahn. 1983. Cloning of the glutamine synthetase I gene from *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 156:168-176.
- Sotomura, M. y M. Yoshikawa. 1975. Reinitiation of chromosome replication in the presence of chloramphenicol under an integratively suppressed state by R6K. *J. Bacteriol.* 122:623-628.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific DNA sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Souza, L., R. Calendar, E. Six y B. Lindqvist. 1977. A transactivation mutant of satellite phage P4. *Virology* 81:81-91.
- Souza, L., J. Geisselsoder, A. Hopkins y R. Calendar. 1978. Physical mapping of the satellite phage P4 genome. *Virology* 85:335-342.
- Sunshine, M., E. Six, K. Barrett y R. Calendar. 1976. Relief of phage P2 amber mutant polarity by the satellite phage P4. *J. Mol. Biol.* 106:673-682.
- Sunshine, M., M. Thorn, W. Gibbs, R. Calendar y B. Kelly. 1971. P2 phage amber mutants: characterization by use of polarity suppressor. *Virology* 46:691-702.
- Timmis, K., F. Cabello y S. Cohen. 1975. Cloning, isolation and characterization of replication regions of complex plasmid genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:4556-4560.
- Vieira, J. y J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268.
- Walker, D. y T. Anderson. 1970. Morphological variants of coliphage P1. *J. Virol.* 5:765-782.
- Ward, D. y M. Gottesman. 1982. Suppression of transcription termination by phage lambda. *Science* 216:946-951.
- Weschler, J. y J. Gross. 1971. *Escherichia coli* mutant temperature-sensitive for DNA synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 113:273-284.
- Wilkins, B., G. Boulnois y E. Lanka. 1981. A plasmid DNA primase active in discontinuous bacterial DNA replication. *Nature* 290:217-221.
- Zeuthen, J. y M. Pato. 1971. Replication of the F'lac Sex Factor in the



cell cycle of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 111:242-255.

Zyskind, J.W., L.T. Deen y D.W. Smith. 1977. Temporal sequence of events during the initiation process in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid replication: role of the *dnaA* and *dnaC* gene products and ribonucleic acid polimerase. *J. Bacteriol.* 129:1466-1475.