

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Sección Biológicas. inéditas



TESIS DOCTORAL

**Proteínas inducidas en *Bacillus Subtilis* infectado por el  
bacteriofago Ø 29**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José López Carrascosa**

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5318223103

T 578.81  
L+  
pro

PROTEINAS INDUCIDAS EN BACILLUS SUBTILIS  
INFECTADO POR EL BACTERIOFAGO Ø 29.

Tesis presentada para optar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
por el licenciado José López Carrascosa

Madrid, Junio de 1.975



R. 36532

Este trabajo, que se presenta como Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, ha sido realizado en la Sección de Genética Molecular del Instituto Gregorio Marañón, bajo la dirección de la Dra. Margarita Salas.

Deseo expresar mi profundo agradecimiento, tanto a mi director de Tesis como al Dr. Eladio Viñuela por su ayuda, apoyo y orientación prestada en el desarrollo del trabajo y en mi formación en el campo de la investigación científica.

Asimismo, quiero hacer constar mi respeto y agradecimiento al profesor J.L. Rodríguez-Candela director del Instituto Gregorio Marañón por su amabilidad y apoyo a lo largo de todo el trabajo, así como a A. Camacho, F. Jiménez, R.P. Mellado, M.R. Inciarte y F. Moreno, por su ayuda material, y a todos mis compañeros por su estímulo y valiosas sugerencias.

Quiero agradecer a las Srtas. P. Zaragoza, E. Cano, V. Gijón, M. Corral y N. Fonturbel, así como a J.M. Lázaro, J. de la Torre y J. López su colaboración técnica.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca para la formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

## ABREVIATURAS.

DNA: ácido deoxiribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

DNasa: deoxiribonucleasa

RNasa: ribonucleasa

ATP: Adenosina 5' - trifosfato

CTP: Citidina 5' - trifosfato

GTP: Guanosina 5' - trifosfato

UTP: Uridina 5' - trifosfato

SDS: Dodecilsulfato sódico

Tris: Trihidroximetil aminoetano

EDTA: etilen diamino tetraacetato

PEG: polietilenglicol

SSC: solución salina-citrato

Butil-PBD: 2 - (4' - tercbutilfenil) -5-(4'' Difenilil) -1, 3, 4-oxa-  
diazol.

PPO: 2, 5 - Difeniloxazol

dimetil POPOP: 1, 4 - bis [2(4-Metil-5 fenil-oxazolil)] benceno

DF: diluyente de fago

sus: sensible a supresor

ts: sensible a temperatura

rpm: revoluciones por minuto

ufp: unidades formadoras de placa

DEAE-celulosa: dietil aminoetil celulosa

## I N D I C E

|  | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| I. INTRODUCCION .....                              | 1             |
| II. MATERIALES                                     |               |
| a) Bacterias y fagos .....                         | 20            |
| b) Medios de cultivo .....                         | 22            |
| c) Productos radioactivos .....                    | 22            |
| d) Electroforesis en geles de poliacrilamida       | 23            |
| e) Determinación de radioactividad .....           | 23            |
| f) Cromatografía .....                             | 24            |
| g) Autorradiografía .....                          | 25            |
| h) Otros productos .....                           | 26            |
| i) Equipo .....                                    | 28            |
| III. METODOS.                                      |               |
| a) Medios de cultivo .....                         | 31            |
| 1) Medio L .....                                   | 31            |
| 2) Medio mínimo .....                              | 31            |
| 3) Medio mínimo de Spizizen .....                  | 31            |
| 4) Medio completo para E. coli C .....             | 32            |
| 5) Medio rico para E. coli K12 .....               | 32            |
| 6) Diluyente de fago .....                         | 32            |
| b) Purificación del fago $\phi$ 29 .....           | 33            |
| c) Valoración del fago $\phi$ 29 normal y mutantes | 35            |
| d) Retrocruzamiento de mutantes sensibles          |               |
| a supresor .....                                   | 36            |

|  |    |
|--|----|
| e) Obtención de antisuero contra $\phi 29$ .....   | 39 |
| f) Preparación de fago marcado radioactivamente .....  | 39 |
| g) Irradiación de <u>B. subtilis</u> 110NA con luz ultravioleta .....  | 42 |
| 1) Efecto del tiempo de irradiación ....   | 42 |
| 2) Incorporación de leucina radioactiva en bacterias infectadas, mediante pulsos a lo largo del ciclo de desarrollo del fago ..... | 43 |
| 3) Marcaje de las proteínas inducidas en bacterias infectadas : experimentos de pulso y caza .....                                 | 45 |
| 4) Preparación de las proteínas marcadas por pulso y caza para electroforesis..  | 46 |
| 5) Marcaje de las proteínas inducidas en bacterias infectadas con mutantes sensibles a temperatura .....                           | 47 |
| I) Mutantes en el cistrón B .....  | 47 |
| II) Mutantes en los cistrones I y J.   | 48 |
| 6) Marcaje de las proteínas inducidas en bacterias infectadas con mutantes sensibles a supresor .....                              | 51 |

|  |    |
|--|----|
| h) Análisis de péptidos trípticos de proteínas radioactivas .....                              | 54 |
| 1) Marcaje de las proteínas y aislamiento  | 54 |
| 2) Análisis de péptidos trípticos .....  | 56 |
| i) Preparación del sistema de síntesis de proteínas <u>in vitro</u> , de <u>E. coli</u> .....  | 57 |
| j) Aislamiento de DNA lineal de $\phi 29$ para el ensayo <u>in vitro</u> .....                 | 59 |
| k) Ensayo de síntesis de proteínas y RNA en el sistema <u>in vitro</u> de <u>E. coli</u> ..... | 61 |
| 1) Método de ensayo .....  | 61 |
| 2) Preparación de las proteínas sintetizadas <u>in vitro</u> para electroforesis .....         | 62 |
| l) Ensayo de actividad lisozima  |    |
| 1) Preparación de filtros marcados radioactivamente .....                                      | 63 |
| 2) Método de ensayo .....  | 64 |
| m) Electroforesis en geles de poliacrilamida.  |    |
| 1) Sistema de pH continuo .....  | 68 |
| 2) Sistema de pH discontinuo .....   | 68 |
| 3) Electroforesis en placa y autorradiografía .....  | 70 |

|   |    |
|---|----|
| n) Recristalización de los reactivos para electroforesis                              |    |
| 1) Acrilamida .....   | 73 |
| 2) N, N'-metilenbisacrilamida .....   | 73 |
| 3) Dodecilsulfato sódico .....  | 74 |
| n) Tinción de proteínas en geles .....  | 74 |
| o) Determinación del peso molecular de los polipéptidos inducidos por $\phi 29$ ..... | 75 |
| p) Determinación de radioactividad .....  | 76 |
| q) Determinación de proteínas .....   | 77 |

#### IV. RESULTADOS

|  |    |
|--|----|
| a) Efecto de la luz ultravioleta sobre <u>B. subtilis</u> 110NA .....  | 78 |
| b) Proteínas inducidas en <u>B. subtilis</u> 110NA irradiado e infectado con el fago $\phi 29$ .....   | 79 |
| c) Coelectroforesis de las proteínas estructurales presentes en la partícula viral y las proteínas estructurales inducidas en bacterias irradiadas marcadas radioactivamente mediante pulso y caza | 84 |



|  |     |
|--|-----|
| d) Cinética de síntesis de las proteínas inducidas por el fago $\phi 29$ .....   | 86  |
| e) Existencia de un precursor de la proteína que forma los apéndices del cuello del fago $\phi 29$ .....                       | 89  |
| f) Bloqueo de la transformación del precursor en proteína NP1, en mutantes sensibles a temperatura en el cistrón B .....       | 91  |
| g) Peso molecular de las proteínas inducidas por el fago $\phi 29$ .....   | 93  |
| h) Proteínas sintetizadas <u>in vitro</u> en presencia de DNA del fago $\phi 29$ .....   | 95  |
| i) Análisis de las proteínas sintetizadas por los mutantes sensibles a supresor de $\phi 29$ en condiciones restrictivas ..... | 98  |
| j) Análisis de las proteínas sintetizadas por los mutantes tsI816 y tsJ116 en condiciones permisivas y restrictivas .....      | 114 |

|                                | <u>Página</u> |
|--------------------------------|---------------|
| V. DISCUSION .....             | 117           |
| VI. CONCLUSIONES .....         | 149           |
| VII. LEYENDAS DE FIGURAS ..... | 151           |
| VIII. BIBLIOGRAFIA .....       | 190           |

I. INTRODUCCION

Los virus bacterianos (bacteriofagos o fagos) han sido objeto de numerosos e importantes estudios en genética y morfogénesis a nivel molecular debido a su gran simplicidad. Constan de un núcleo de material genético (DNA ó RNA), cubierto por una estructura proteica regular compuesta de una ó pocas moléculas distintas de proteína.

Su capacidad de replicación y la forma de recubrir el material genético con un mínimo de gasto informativo han hecho de los bacteriófagos un material muy adecuado como sistema modelo para abordar los problemas presentados en la comprensión de la estructura y función de macromoléculas.

La estricta ordenación de sucesos que sobrevienen cuando un virus infecta una bacteria requiere una maquinaria de control de la aparición y (ó) del momento de actuación de las proteínas sintetizadas por el virus. Tanto la replicación del material genético viral como la formación de la cápsida proteica, en los casos estudiados, indican la existencia de controles que aseguran la can-

tividad apropiada de cada proteína en cada momento del ciclo funcional del virus.

La maquinaria bacteriana de síntesis proteica utilizada por el virus para su multiplicación presenta varios niveles donde controlar la síntesis de las proteínas inducidas por la infección viral.

A nivel ribosómico se conocen una serie de factores (IF3) que permiten la traducción específica de distintos RNA mensajeros (1,2), así como otros factores (factores de interferencia) que reducen la síntesis de determinadas proteínas (3).

Sin embargo, los controles más estudiados de la expresión del material genético de los virus, se han descrito a nivel de la transcripción de DNA a RNA mensajero. La aparición de los RNA mensajeros especificados por el DNA de los virus bacterianos suele ser secuencial:

a) Aparición de RNA mensajero inmediatamente después de la infección. Estos mensajeros se denominan tempranos y su traducción produce las llamadas proteínas tempranas.

b) Síntesis de RNA mensajero tardío, que produce las proteínas tardías.

Los mensajeros tempranos se suelen caracterizar por estar producidos por la RNA polimerasa de la bacteria huésped. Se pueden detectar aún en ausencia de síntesis de proteínas (por adición de antibióticos como el cloramfenicol), lo que indica que el enzima que realiza la transcripción del DNA para dar lugar a los RNA mensajeros tempranos estaba ya presente antes de la infección.

La aparición de RNA mensajero tardío implica un sistema de transcripción parcial ó totalmente nuevo y específico del virus. En los fagos de E. coli T3 y T7 aparece una nueva RNA polimerasa inducida (4-7), que es capaz de sintetizar los RNA mensajeros tardíos.

En el caso de los colifagos  $\lambda$  y T4 el mecanismo para la síntesis de RNA mensajeros tardíos es distinto y más complejo. Se han detectado proteínas específicas del virus que son necesarias para la transcripción tardía. Entre otras, el producto del gen 55 en T4 (8), y el producto del gen Q en  $\lambda$  (9-11), aunque este último pueda resultar parcialmente dispensable (12).

Los productos de ambos genes se han encontrado unidos a la respectiva RNA polimerasa del huésped, indicando que esta modificación del enzima bacteriano está implicada en el control de la síntesis del RNA mensajero tardío.

El bacteriófago  $\phi$  29 que infecta a Bacillus subtilis, y otras bacterias relacionadas, como B. amiloliquefaciens, contiene un DNA de doble cadena de peso molecular  $11 \times 10^6$  (13-15), que se puede aislar a partir del virus como un círculo cerrado no covalentemente por una proteína específica (15). Teniendo en cuenta que el DNA del fago T7 tiene un peso molecular de  $26 \times 10^6$  (16), el del fago  $\lambda$  de  $33 \times 10^6$  (17) y el del fago T4 de  $110 \times 10^6$  (18), el pequeño tamaño del DNA del fago  $\phi$  29 le hace

un material idóneo para el estudio de la genética y el control de la expresión del DNA para dar lugar a la síntesis de RNAs mensajeros y proteínas virales. Si tenemos en cuenta que la transcripción es asimétrica (sólo se transcribe una banda del DNA en cada zona) (19-21) el tamaño del DNA de  $\phi$  29 tiene información para especificar la síntesis de un reducido número de proteínas (entre 15 y 20 proteínas de tamaño medio).

En el bacteriófago  $\phi$  29 se han detectado 7 proteínas estructurales con un peso molecular total de 357.000 (22). Esta masa de proteína representa el 60% de la información genética del DNA de  $\phi$  29, con lo que el estudio de las funciones del resto de las proteínas no estructurales inducidas por el virus, puede ser más simple que en el caso de fagos como T4 (que es material clásico de estudio). En efecto, el DNA de T4 tiene capacidad para determinar la síntesis de 10 veces más proteínas que el DNA de  $\phi$  29 (150 a 200). En el fago T4, se han obtenido mutantes en 80 cistrones (23) mientras que en el fago  $\phi$  29, los mutantes letales condicionales aislados (sensibles a temperatura y sensibles a supresor), se han distribuido entre 15 y 17 grupos de complementación (24-28).



Experimentos recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio, en los que se ha realizado la complementación de los cistrones establecidos por Reilly y Anderson con mutantes sus de  $\phi$  29 (26) con los grupos de complementación determinados por Moreno y colaboradores entre mutantes sus (28) y ts (25), han indicado la existencia de 18 genes distintos en el DNA de  $\phi$  29 (29).

La detección de las proteínas inducidas por fagos como T4 y T5 no presenta dificultades, ya que la infección por el virus detiene la síntesis de proteínas de la bacteria (30, 31).

Otros fagos como T7 y  $\lambda$  inhiben parcialmente la síntesis de proteínas del huésped (32, 33).

Sin embargo, el fago  $\phi$  29 cuando infecta a B. subtilis no detiene la síntesis de proteínas del huésped. Para lograr disminuir esta síntesis hasta unos niveles que permitieran la identificación de las proteínas inducidas por el virus, se ha utilizado la irradiación con luz ultravioleta de la bacteria antes de la infección con el fago (34 - 36).

La aplicación de esta técnica nos ha permitido detectar en B. subtilis irradiado e infectado con  $\phi 29$ , además de las 7 proteínas estructurales, otras 12 proteínas no estructurales. Estas últimas representan un peso molecular total de 195.500 que corresponde a un 35% del contenido de información genética del DNA de  $\phi 29$ .

Las proteínas inducidas por  $\phi 29$  pueden clasificarse, de acuerdo con su tiempo de aparición después de la infección, en tempranas y tardías. Las 7 proteínas estructurales y 3 no estructurales, son tardías, mientras que las otras 9 proteínas no estructurales aparecen inmediatamente después de la infección.

La síntesis de proteínas tempranas y tardías de  $\phi 29$ , está de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (37) y en otros (38 - 41), que demuestran la existencia de dos tipos de RNA específico de  $\phi 29$ . El RNA temprano se transcribe de una de las bandas del DNA (banda L) y el RNA tardío de la otra banda (banda H) (42, 38, 39). La síntesis de este RNA tardío va en paralelo con la síntesis del DNA, pero es independiente de ella (40).

Estudios sobre el control de la transcripción del DNA del fago  $\phi$  29, han indicado que la infección no produce una nueva RNA polimerasa, ni se ha detectado ninguna modificación de la polimerasa preexistente en el huésped (37, 43). Queda abierta la posibilidad de que se trate de un factor con afinidad por el DNA de  $\phi$  29, que al interaccionar con el mismo permita de algún modo la transcripción de los genes tardíos, o de que se trate de una modificación aún no detectada de la polimerasa del huésped.

Para determinar el factor responsable de la aparición de proteínas tardías, se realizaron estudios con mutantes letales condicionales del fago  $\phi$  29. El mutante sus O56 (sensible a supresor), cuando infecta a B. subtilis 110 NA (condiciones restrictivas para su desarrollo) no produce proteínas tardías, lo que indica que la proteína especificada por el gen O puede estar implicada en el control de la aparición de las proteínas tardías inducidas por  $\phi$  29, posiblemente a nivel de transcripción, aunque no se descarta que exista un control adicional en la traducción de las proteínas tardías.

La construcción de las partículas virales y la encapsulación del material genético en ellas plantea una serie de problemas que han sido estudiados recientemente. El bacteriófago  $\phi 29$  presenta una serie de ventajas para el estudio de su morfogénesis, ya que posee una morfología complicada, y su DNA especifica un número reducido de proteínas. La partícula viral está formada por una cápsida en forma de icosaedro prolato, de la que irradian unas fibras. Completan la partícula, el cuello formado por 2 collares y 12 apéndices, y la cola cuya parte distal es más ancha que la que está en contacto con el collar inferior (14).

Las proteínas estructurales están distribuidas en la partícula del modo siguiente: tres de ellas se encuentran en la cápsida (HP1 que es la mayoritaria, HP2 minoritaria y HP3, que forma las fibras), otras tres en el cuello (NP1 forma los apéndices, NP2 el collar superior y NP3 el collar inferior), y una en la cola (TP1) (22).

De las diez proteínas tardías inducidas por  $\phi 29$ , siete son estructurales. Sólo las tres proteínas tardías no estructurales y alguna proteína temprana son buenos candidatos para ejercer funciones morfogenéticas (es de-

cir, que intervengan en la construcción del virus pero que no estén presentes en la partícula viral madura). El problema de detectar la existencia de proteínas morfogenéticas es más simple de abordar que en otros fagos como T4, en los que hay más de 40 genes implicados en la morfogénesis del virus (44, 45).

Entre los procesos implicados en la construcción de las partículas virales se ha descrito la transformación de ciertas proteínas en otros polipéptidos relacionados estructuralmente con ellas.

En el fago T4, cuatro proteínas de la cabeza (P23, P24, P22, e IPIII), se transforman en polipéptidos de menor peso molecular durante el proceso de maduración del virus de manera que las proteínas transformadas forman parte de la estructura final del fago (46-50).

Las proteínas estructurales de la cabeza del bacteriófago  $\lambda$  representan una cantidad de información genética que supera la capacidad teórica de la zona del DNA del fago que se encarga de especificarlas. El estudio de

estas proteínas ha revelado que las proteínas X1 y X2 provienen de la fusión de la proteína mayoritaria de la cápsida (proteína E), y de otra que no forma parte del virus maduro (proteína C) (51). Por otra parte, la proteína del gen b (12), así como la proteína del gen H (52), se transforman en polipéptidos de menor peso molecular, que forman parte de la cápsida madura y de la cola, respectivamente.

En el colifago P2, existen también dos proteínas precursoras de productos de menor peso molecular: la proteína producto del gen N se transforma en la proteína mayoritaria de la cápsida y la especificada por el gen O, es precursora de una proteína morfogenética no estructural. La transformación es mediada por una ruptura proteolítica del precursor (53).

Mecanismos similares se presentan en otros fagos como T5 (54), y en virus animales como adenovirus (55), virus de la encefalomiocarditis (56), sindbis (57) y polioma (58).

No se conoce la significación exacta de estas trans-

formaciones de proteínas implicadas en el proceso de formación de las partículas virales, aunque se especula que puedan señalar pasos irreversibles en la maduración morfogénica.

Para estudiar la posible existencia de proteínas precursoras entre las proteínas inducidas por  $\phi 29$ , se realizaron experimentos de pulso con aminoácidos radioactivos y caza de las proteínas marcadas en presencia de un exceso de aminoácidos no radioactivos. Estos experimentos mostraron la existencia de un precursor de la proteína que forma los apéndices del cuello en la partícula viral (NP1). No se encontró evidencia de precursores de otras proteínas estructurales o no estructurales inducidas después de la infección con  $\phi 29$ .

Es posible que la transformación de la proteína precursora de los apéndices del cuello en el polipéptido que forma parte de la estructura final de la partícula viral juegue algún papel en algún paso de la morfogenesis del fago  $\phi 29$ .

La existencia de 19 proteínas inducidas por  $\phi 29$  en B. subtilis irradiado con luz ultravioleta y de 18 cistro-

nes en el DNA de  $\phi 29$ , sugería que la mayor parte de las proteínas inducidas por el fago al infectar la bacteria son determinadas por el propio DNA del virus y no inducidas en la bacteria por la infección viral. Para estudiar este problema se preparó un sistema de síntesis de proteínas in vitro de E. coli dirigido por el DNA de  $\phi 29$ . En estos sistemas de síntesis de proteínas in vitro, se han ensayado con éxito la síntesis de las proteínas del fago M3 (59) y del fago f1 (60). También se ha detectado la síntesis de diversos enzimas como la  $\beta$ -galactosidasa por el DNA del fago  $\phi 80$  (61), la fosfatasa alcalina, dirigida por el RNA mensajero de E. coli (62),  $\beta$ -glucosiltransferasa dirigida por el DNA de T4 (63), la deoxicitidilato deaminasa dirigida por el DNA de T4 y de los fagos de B. subtilis, SP82 y SP5C (64) y la lisozima dirigida por el DNA de T4 (65) y por el DNA de T7 (66).

Una de las actividades enzimáticas inducidas en B. subtilis infectado con el fago  $\phi 29$  es lisozima (37). En el sistema de síntesis de proteínas in vitro preparado para nuestros experimentos se consiguió detectar esta actividad enzimática, cuya síntesis era totalmente



dependiente del DNA de  $\phi 29$ . Estos resultados aseguraban un buen grado de fidelidad en la transcripción del DNA, y la traducción del RNA mensajero en el sistema de síntesis de proteínas in vitro.

Utilizando este sistema dirigido por el DNA de  $\phi 29$ , se detectó la síntesis de RNA temprano específico de  $\phi 29$  (67), así como la síntesis de todas las proteínas tempranas inducidas in vivo cuando el fago infecta a B. subtilis irradiado, excepto una proteína minoritaria de movilidad electroforética similar a la proteína estructural HP3. Estos resultados demuestran que todas las proteínas sintetizadas en estas condiciones están especificadas por el DNA de  $\phi 29$ .

Por otra parte, la no aparición de proteínas tardías indica que el mecanismo que controla su síntesis in vivo, no opera en las condiciones del sistema in vitro.

Como ya hemos comentado, en nuestro laboratorio se han aislado una serie de mutantes letales condicionales (25, 28) que por complementación con otros mutantes de

la colección de Reilly y col., (26), se han distribuido en 18 grupos de complementación (29). Puesto que se han detectado 19 proteínas inducidas por  $\phi 29$  en B. subtilis irradiado, es muy probable que se hayan conseguido mutantes en la mayoría de los genes del DNA de  $\phi 29$ .

Para establecer las proteínas especificadas por los distintos genes del DNA de  $\phi 29$ , se emplearon mutantes del virus sensibles a supresor (sus). Estos mutantes son letales condicionales y se han estudiado principalmente en el caso de los fagos lambda (68) y T4 (69). Los mutantes sus presentan en su DNA una mutación que determina la existencia de un triplete de terminación (UAG o ambar, UAA u ocre y UGA u ópalo) en una zona donde normalmente existe un triplete que especifica a un aminoácido de una proteína. La existencia de estas señales de terminación anormales en el RNA mensajero de un mutante provoca la interrupción de la traducción del mensaje genético, ya que en las bacterias normales ( $su^-$ ), no existe ningún RNA de transferencia capaz de reconocer al triplete de terminación y de introducir un aminoácido (70), y por lo tanto, se produce una proteína incompleta o fragmento. La longitud del fragmento es función de la posición de la mutación en el cistrón (71).

5318223103

Esta característica permite la identificación de la proteína determinada por el gen mutado, ya que el fago mutante, al infectar a una bacteria,  $su^-$ , producirá todas las proteínas normales excepto la proteína determinada por el gen mutado, y en su lugar aparecerá un fragmento o bien desaparecerá totalmente, ya que algunos fragmentos son fácilmente degradables.

Existen bacterias supresor positivas ( $su^+$ ), que poseen un RNA de transferencia mutado de tal manera que es capaz de reconocer un determinado tipo de triplete de terminación. Cuando se infecta una bacteria  $su^+$  con un fago sensible a supresor, el RNA de transferencia mutado de la bacteria es capaz de reconocer la señal de terminación en posición errónea que posee el RNA mensajero especificado por el DNA del virus mutante e introduce un aminoácido en el lugar donde en condiciones restrictivas (bacteria  $su^-$ ) se produce la terminación de la lectura. Si el aminoácido introducido por el RNA de transferencia de la bacteria  $su^+$  permite que la proteína viral sea funcional, la infección de la bacteria  $su^+$  por el mutante sus del virus será productiva (condiciones permisivas de desarrollo para el mutante sus).

Con los mutantes sensibles a supresor obtenidos en nuestro laboratorio (28) y los de la colección de Reilly y col., (26), se han determinado las proteínas especificadas por 13 genes de  $\phi 29$ . Además, se ha obtenido evidencia de que la proteína especificada por el gen O está implicada en el control de la síntesis de las proteínas tardías de  $\phi 29$ .

La existencia de proteínas tempranas y tardías inducidas por  $\phi 29$  y la localización de los genes que las determinan en el mapa genético de  $\phi 29$ , nos ha permitido establecer tres zonas del DNA cuya transcripción da lugar a la síntesis de proteínas tempranas, y dos zonas que contienen genes de expresión tardía.

Los genes que especifican las proteínas estructurales de  $\phi 29$ , están agrupados en el mapa genético del DNA del virus. Este agrupamiento de genes que determinan proteínas relacionadas en su función, ha sido descrito en varios virus. En el genoma del fago  $\lambda$ , los siete genes que controlan la formación de la cabeza (72) y la maduración del DNA (73) están situados en el extremo izquierdo del mapa genético. Los once genes que intervienen en la for-

mación de la cola están agrupados a la derecha de los genes que especifican la síntesis de las proteínas de la cabeza (74).

En T4, existen agrupaciones de genes que controlan la morfogénesis de la cola (45), así como de las proteínas internas que forman parte de una estructura intermedia en la morfogénesis de la cabeza (50). En el fago P22 de Salmonella existe una agrupación similar de los genes que determinan las proteínas relacionadas con la morfogénesis de la cabeza (75). Estas agrupaciones pueden sugerir según Casjens y Hendrix (76) que los genes estén ordenados de tal manera que indiquen el orden en que actúan en un determinado proceso las proteínas determinadas por ellos.

Schachtele y cols. han demostrado que el RNA mensajero temprano de  $\phi 29$  se transcribe de la banda L del DNA mientras que el RNA tardío hibridiza preferencialmente con la banda H del DNA (39). Por tanto, la transcripción temprana y tardía del DNA de  $\phi 29$  llevan sentidos opuestos ya que las dos cadenas del DNA son antiparalelas, y la transcripción del DNA se realiza siempre en

dirección 3' - OH a 5' - fosfato para dar lugar a RNA mensajero que crece en la dirección 5' - fosfato a 3' - OH. Debido a la existencia de estos datos y basándonos fundamentalmente en el efecto polar del gen E sobre el gen H (28) hemos determinado la dirección de la transcripción de los genes de  $\phi 29$  en el mapa genético del fago.

El estudio de los promotores tempranos del DNA de  $\phi 29$  mediante la formación de complejos RNAPolimerasa-DNA realizados en nuestro laboratorio (77), ha mostrado la existencia de tres promotores tempranos que coinciden con los promotores teóricos previstos en el mapa genético de  $\phi 29$ , teniendo en cuenta las zonas de transcripción temprana del DNA.

## II. M A T E R I A L E S

## MATERIALES.

### a) Bacterias y fagos

Bacillus subtilis 110 NA es un mutante que no esporula de B. subtilis 168 try<sup>-</sup>, obtenido del Dr. F. Moreno.

La bacteria huésped permisiva para los bacteriófagos sensibles a supresor fué B. subtilis 168 MO-99 [Met<sup>-</sup> thr<sup>-</sup>]<sup>+</sup> su<sup>+</sup> spoOA-3NA preparado por el Dr. F. Moreno (28) por transformación de B. subtilis 168 Mu 8μ 5μ5 leu<sup>-</sup> [met<sup>-</sup> thr<sup>-</sup>]<sup>+</sup> su<sup>+</sup> spo<sup>+</sup> (78) con DNA de B. subtilis Marburg spo OA-3NA su<sup>-</sup> (79) obtenido del Dr. P. Schaeffer.

La preparación de fago Ø29 se realizó en la bacteria Bacillus amyloliquefaciens estirpe HM, obtenida originalmente del Dr. B. E. Reilly.

Para la incorporación del ácido α, ε diaminopimélico-H<sup>3</sup> se usó E. coli C, obtenido del Dr. M. Schweiger.



Para la obtención de los componentes del sistema in vitro de síntesis de proteínas, se utilizó la bacteria E. coli K12 estirpe 7 glpR<sup>C</sup>, fosfatasa alcalina<sup>-</sup>, de la colección del Dr. García Ballesta.

El bacteriófago  $\phi$ 29 fue obtenido originalmente del Dr. B.E. Reilly.

Los mutantes sensibles a supresor F515, K91, E136, H542, M1241, P112, D241, O56, I44, L55, L53, B47, N212 y A422 pertenecen a la colección de Moreno y cols (28).

Los mutantes E626, G614, F769, R629 pertenecen a la colección de Reilly y cols (26) y se llamaron respectivamente sus Q626, J614, G769 y R629 debido a su localización (29) en los cistrones descritos por Moreno y cols (28).

Los mutantes sensibles a temperatura tsB66, tsB73, tsB74 y tsJ116 eran de la colección de Talavera y cols (25).

El mutante sensible a temperatura ts I810 pertenece a la colección de Moreno y cols. (28).

b) Medios de cultivo:

La triptona, extracto de levadura, el agar, la peptona y los casaminoácidos se compraron a Difco.

La D-glucosa a Fisher Scientific Co., los L-aminoácidos a Sigma Chemical Co., el antiespumante Rhodosil a Hispania S.A., las sales a Merck y la gelatina a BDH.

c) Productos radioactivos:

Leucina- $H^3$  (1 mC/ml, 0,002 mgr/ml) y Leucina- $C^{14}$  (100  $\mu$ C/ml, 0,023 mgr/0,5 ml), se compraron a New England Nuclear. Metionia -  $S^{35}$  (5 mC/5,6 ml, 0,04 mgr/5,6 ml), Metionia -  $H^3$  (1 mC/ml, 6,4 Ci/mmol), ácido  $\alpha$ - $\epsilon$ , diaminopimélico- $H^3$  (1 mc/ml, 200  $\mu$ c/ umol) el hidrolizado de proteína -  $C^{14}$  (50  $\mu$ C/ml. 58 mC/m.átomo de Carbono) y el hidrolizado de proteína -  $H^3$  (1 mC/ml, TRK 440, B.5) se compraron a The Radiochemical Center, Amersham.

d) Electroforesis en geles de poliacrilamida:

La acrilamida y la N,N'-metilenbisacrilamida compradas a Bio-Rad Laboratories, se utilizaron sin recristalizar.

La acrilamida de Serva Feinbiochemica GMBH. Co. y la N,N'-metilenbisacrilamida de Merck se recristalizaron antes de usarse. La tetrametiletildiamina se compró a Eastman Chemical Co., el SDS a Sigma Chemical Co., y el persulfato sódico a Canaleco.

La urea se compró a Fisher y se desionizó con resina mixta de cambio iónico obtenida de Seta.

e) Determinación de radioactividad.

El butil-PBD se compró a Ciba Limited, el 2,5-difeniloxazol (PPO) y el dimetil POPOP, a Sigma Chemical Co., el tolueno a Carlo Erba y el papel de fibra de vidrio (Whatman GF/C y GF/A), a Reeve Angel.

f) Cromatografía.

La DEAE-celulosa se obtuvo de Serva Feinbiochemica, GMBH Co. Antes de su uso se eliminaron finos por suspensión en agua destilada y decantación posterior. Se agitó después con 5 volúmenes de ClH 0,5 M durante 20 minutos, se filtró y se lavó con agua hasta pH4. La pasta de celulosa se resuspendió en 5 volúmenes de Na OH 5 M y se agitó durante 20 minutos, filtrándose a continuación y lavando hasta pH8. La columna se empaquetó a presión y se equilibró con 20 volúmenes del tampón de muestra.

El Spherosil, tipo c, de diámetro de poro 20-40 m  $\mu$ , se adquirió a Serva. Para su preparación se resuspendió en agua destilada y se desaireó durante 30 minutos bajo vacío. Se lavó con dos volúmenes de Cl H 1 M durante 30 minutos, filtrándose a continuación y lavándose con agua destilada hasta neutralidad. Después se trató con 2 volúmenes de NH<sub>4</sub>OH 1 M y se lavó hasta neutralidad con agua destilada. Por último se equilibró con 5 volúmenes del tampón de muestra, y se empaquetó sin presión.

La resina Beckman tipo PA-35 se compró a la División Spinco de Beckman Instruments Inc. Para prepararla, se trató con 10 volúmenes de NaOH 4% y se filtró. Se lavó con 10 volúmenes de agua destilada y luego con 10 volúmenes de acético 2M, y sucesivamente con 10 volúmenes de agua destilada y 10 volúmenes de Piridina 2 M-acético, pH5. La resina se lavó con 10 volúmenes de agua y se empaquetó bajo presión.

g) Autorradiografía.

La película utilizada fué Kodirex para Rayos X de Kodak.

Se utilizaron indistintamente el Revelador Rápido para rayos X y el revelador DX-80, así como el fijador Acido Rápido o el fijador FX-40 para película de rayos X. Todos estos productos se compraron a Kodak.

El celofán Handi-Wrap, se compró a The Dow Chemical Co.

#### h) Otros productos.

Las proteínas marcadoras seroalbúmina bovina, inmunoglobulina G, cadena pesada, quimotripsinógeno, mioglobina y citrocromo C, se compraron a Mann Research Laboratories y a Calbiochem.

La tripsina TPCK se compró a Worthington Chemical Co., el cloruro de cesio y el polietilenglicol 6000 a Serva, y el reactivo Folin-Ciocalteu a Merck.

La ovoalbúmina, seroalbúmina bovina, la lisozima de clara de huevo, 2-mercaptoetanol, fosfoenol piruvato, las esferas de vidrio y los trifosfatos de adenosina, citidina, guanosina y uridina a Sigma Chemical Co.

El ditiotreitol se obtuvo de Calbiochem y el leucovorin cálcico de Cyanamid Ibérica S.A.

La DNasa pancreática (electroforéticamente pura ó recristalizada una vez) y la RNasa pancreática (recristalizada una vez), se obtuvieron de Worthington Chemical Co.

El adjuvante de Freund se compró a Difco.

La pronasa (proteasa de *Streptomyces griseus*) grado B, se compró a Calbiochem y se autodigirió según el método de Young y Sinsheimer (80) del modo siguiente:

Una solución de 10 mgr/ml en Tris-ClH 10 mM, EDTA 20 mM pH8,1, se incubó durante 3 horas a 37°C; a continuación se calentó 5 minutos a 80°C enfriándose después rápidamente en hielo y conservándose congelada.

El fluoruro de fenil-metilsulfonilo se compró a Sigma, el etanol, el cloroformo, el eter, la acetona y el ácido tricloroacético a Merck.

El isopropanol y el ácido acético glacial a Carlo Erba.

El fenol a Baker, el azul brillante de Coomanie R-250 a Serva, la sacarosa a May & Baker Ltd y el papel Whatman 3MM a Whatman.

El t-RNA de E. coli B se obtuvo del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Nueva York.

i) Equipo:

Fermentadores de 22 litros de Belenger S. A.

Baños de agua con agitación rotatoria de New Brunswick Co. Inc., modelo G-76.

Baño de ambiente regulado por aire con agitación rotatoria de New Brunswick Co. Inc., modelo G-25.

Baños de incubación de Kowell y Lab-line Instrument Inc.

Centrifugas: Sorvall modelos SS3, RC2-B y Sharples tipo 24B para flujo continuo.

Ultracentrifugas: Spinco de Beckman modelos L2-50, L2-65 y L3-50.

Espectrofotómetros: Beckman DU-2 y DB-GT y Spectronic.



Cámara termostatzada con colector de fracciones ISCO modelo 600, con registro modelo UA4.

Estufas: Elektro Helios.

pHmetro Radiometer, modelo 25 con escala expandida.

Liofilizador Virtis, modelo 1000145-MRBA.

Fuentes de alimentación: E-C. Apparatus Corp. Gelman. Instrument Company y Buchler Modelo 3-1014A.

Cubetas de electroforesis: Hoefer Scientific Instruments para geles cilíndricos y SE520.

Balanzas: Sartorius y Ohans.

Contador de colonias New Brunswick modelo C110.

Fraccionador de geles Mickle.

Homogenizador Sorvall Omnimixer.

Contadores de centelleo líquido: Packard Tri-Carb  
modelos 3003, 3320 y Nuclear Chicago Marck II.

Lámpara germicida de 15 W de General Electric.

Baño termostatzador Lauda K2R.D.

Placa calefactora EGA.

Densitómetro Chromoscan MKII de Joyce, Loebel Co.

### III. M E T O D O S

## METODOS.

### a) Medios de cultivo:

1) Para el crecimiento de B. amyloliquefaciens, estirpe HM, en fermentadores, y para el cultivo de bacterias para la valoración del fago  $\phi$  29, se utilizó medio L (81) compuesto por triptona, 10 gr/l, extracto de levadura, 10 gr/l y cloruro sódico, 5 gr/l, suplementado con cloruro de manganeso 0,01 mM y glucosa 20 mM.

2) Para los experimentos de marcaje de las proteínas inducidas por el fago  $\phi$  29, (y para marcar el fago con  $H^3$ ) la bacteria huésped se creció en medio mínimo, que contiene  $PO_4 Na_2$  50 mM,  $PO_4 H_2 K$  50 mM,  $Cl NH_4$  10 mM,  $Cl_2 Mg$  5 mM,  $Cl_2 Ca$  0,1 mM,  $Cl_2 Mn$  0,01 mM,  $SO_4 (NH_4)_2$  1 mM,  $SO_4 Zn$  0,01 mM, glucosa 20 mM y aminoácidos como se indican en cada experimento. Además, se añaden 0,01 ml de solución de trazas de metales por litro de medio; esta solución contiene 2,5 mgr de  $Cl_2 Co \cdot 6H_2O$ , 0,25 mgr  $SO_4 Cu \cdot 5H_2O$  y 2,5 mgr de  $Mo_7 O_{24} (NH_4)_6$  por litro (82).

3) Para la preparación de fago  $\phi$  29 marcado radioactivamente con  $C^{14}$  se creció la bacteria huésped en medio

mínimo de Spizizen (83) que contiene  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  100 mM,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  50 mM,  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  15 mM, citrato trisódico 5 mM,  $\text{ClNa}$  100 mM,  $\text{SO}_4\text{Mg}$  1 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  0,01 mM, cada uno de los aminoácidos 0,05 mM o como se indican en cada experimento y glucosa 20 mM.

4) La preparación de E. coli C marcado con ácido diaminopimélico- $\text{H}^3$  se llevó a cabo en medio completo que contenía 5 ml de solución A (21 gr de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , 9 gr de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  y 2 gr. de  $\text{ClNH}_4$  por litro), 2,5 ml de solución B (4 ml de gelatina 1%, 60 gr de casaminoácidos y 120 ml de glicerina por litro), 0,25 ml de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,1M y el resto de agua hasta completar 10 ml.

5) E. coli K12, estirpe 7 se creció en medio que contiene, por litro los siguientes componentes: 10 gr. de peptona en 50 ml de mezcla glicerol (3000 gr de glicerol, 3,3 gr de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 1 gr de gelatina, 100 gr de  $\text{ClNH}_4$  y 30 gr de  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot \text{H}_2\text{O}$  por 5 litros), 5 gr de glucosa y 30 ml de tampón fosfato (que contiene 1500 gr de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  y 575 gr de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  en 5 litros).

6) El tampón utilizado como diluyente de fago (D.F.) contiene Tris  $\text{ClH}$  50 mM, pH7,8,  $\text{ClNa}$  0,1M y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  10 mM.

b) Purificación del fago  $\phi$  29.

El bacteriófago  $\phi$  29 se purificó siguiendo el método desarrollado por V. Rubio en nuestro laboratorio (84),

B. amyloliquefaciens, estirpe HM, se creció en fermentadores de 22 l. conteniendo 17 l. de medio L (Métodos a, 1), suplementado con cloruro de manganeso 0,01 mM, glucosa 20 mM y Rhodosil antiespumante 0,5% (v/v), hasta una densidad de  $2 \times 10^8$  cels/ml; en ese momento, el cultivo se infectó con  $\phi$  29 a una multiplicidad de 2 fagos por bacteria, continuándose la incubación a 37°C con fuerte agitación, hasta lisis. Al lisado se añadieron 100  $\mu$ gr/ml de lisozima, DNasaI y RNasa pancreática hasta una concentración final de 0,2  $\mu$ gr/ml y  $Cl_2Mg$  5 mM. Se incubó 30 minutos, centrifugándose a continuación en una centrífuga Sharples de flujo continuo para eliminar restos celulares.

El fago se concentró por adición de polietilenglicol 6000 hasta concentración final de 10% (peso/volumen), manteniendo la mezcla en reposo a 4°C durante la noche. La fase superior se decantó y la fase de polietilenglicol, que contenía la mayor parte del fago, se centrifugó

30 minutos a 8000 rpm en el rotor GSA de la centrifuga Sorvall, obteniéndose un sedimento que se disolvió en diluyente de fago.

A esta solución se añadió de nuevo RNasa pancreática, DNasa y liozima a las mismas concentraciones antes indicadas, y se incubó 30 minutos a 37°C. Se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos en el rotor GSA, y el sobrenadante se pasó por una columna de Spherosil (35 x7,5 cm) equilibrada con diluyente de fago, eluyéndose el fago con el mismo tampón. Las fracciones que contenían el virus se juntaron y se centrifugaron 4 horas a 19.000 rpm en el rotor 19 de la ultracentrifuga Spinco L3-50 a 4°C; el sedimento, que contenía el fago, se resuspendió en un pequeño volumen de DF y, para purificarlo posteriormente, se centrifugó hasta equilibrio de densidad en un gradiente de cloruro de cesio de densidad media 1,43 gr/ml durante 24 horas a 29.000 rpm en el rotor 30 de la ultracentrifuga Spinco L2-50 a 15°C. Las fracciones que contenían el fago se dializaron frente a DF y se conservaron a 4°C.

c) Valoración del fago  $\phi$ 29 normal y mutantes.

Se empleó como bacteria indicadora B. subtilis 110NA para fago normal y mutantes sensibles a temperatura, y B. subtilis MO-99 su <sup>+</sup> 3 para los mutantes sensibles a supresor.

La bacteria indicadora se creció en medio L suplementado con glucosa 20 mM hasta una concentración aproximada de  $5 \times 10^7$  células/ml. El agar semisólido contenía medio L suplementado con 0,6% (peso/vol.) de agar. El agar usado en las placas Petri contenía medio L suplementado con 1,6% (peso/vol.) de agar.

La valoración de  $\phi$ 29 se realizó según el método Adams (85): 0,5 ml de un cultivo de bacteria indicadora se mezcló con 0,1 ml de fago diluido hasta la concentración adecuada en D.F. La mezcla se extendió sobre una placa de Petri que contenía aproximadamente 25 ml de agar sólido. Una vez solidificada la mezcla de agar-células-fago, se incubó la placa durante la noche en una estufa a 30°C, apareciendo una placa de lisis en el cespel



de bacteria indicadora, por cada fago (o bacteria infectada) presente. Teniendo en cuenta el número de placas obtenidas y la dilución realizada, se puede calcular la cantidad de fago original. Las valoraciones del fago están realizadas con un mínimo de dos diluciones distintas.

La determinación del fago total producido a lo largo de la infección en la bacteria huésped, se realizó tomando alícuotas de 5  $\mu$ l del cultivo infectado que se diluyeron en 0,5 ml de diluyente de fago, con 250  $\mu$ gr de lisozima. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, y se plaquearon como se ha descrito. El número de placas de lisis obtenidas, corresponde al número de fagos maduros presentes en cada momento.

d) Retrocruzamiento de mutantes sensibles a supresor.

B. subtilis 168 MO-99 su<sup>+3</sup>, bacteria permisiva para los mutantes sensibles a supresor, se creció en medio L (Métodos a, 1) a 37°C hasta que la densidad del cultivo fue de  $1 \times 10^8$  bacterias por ml.

A 1 ml de bacterias así crecidas, se añadieron los mutantes que se iban a retrocruzar (E136, M1241, D241, I44, A422, L55 y L53) a una multiplicidad de infección de 10 fagos por bacteria, y a cada cultivo infectado se añadió  $\phi$ 29 normal también a una multiplicidad de 10 fagos por bacteria.

Se incubaron 10 minutos a 30°C en reposo, y se añadió 10  $\mu$ l de antisuero contra  $\phi$ 29 (Métodos, e), incubándose durante 5 minutos en reposo. Los cultivos se diluyeron 5.000 veces en medio L, y se incubaron 105 minutos a 30°C con agitación fuerte, al cabo de los cuales se añadieron 250  $\mu$ l de cloroformo y se incubaron 10 minutos a 30°C con agitación para lisar las células. Una alícuota de 0,1 ml del lisado se plaqueó como se describe en Métodos c) utilizando Bsubtilis 168 MO-99 su<sup>+3</sup> como bacteria indicadora.

Las placas de lisis obtenidas se pincharon sobre unas placas que tenían bacteria permisiva (B. subtilis 168MO-99) y otras que tenían bacteria no permisiva (B. subtilis 110 NA). Los mutantes que no crecían sobre la bacteria no permisiva y que crecían sobre la permisiva se aislaron y se retro-

cruzaron otras dos veces con el fago  $\phi$  29 normal como se ha indicado antes.

Las placas de lisis correspondientes a los mutantes retrocruzados 3 veces se resuspendieron en diluyente de fago (Métodos a, 6) y se plaquearon sobre la bacteria permisiva hasta lisis confluyente (entre 5000 y 10000 plácas de lisis por placa Petri). Se añadió 4,5 ml de diluyente de fago por placa Petri (unas 10 placas Petri por mutante) y se incubó a temperatura ambiente durante 6 horas.

A continuación, se recogió el sobrenadante de las placas y se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm en el rotor SS34, de la centrifuga Sorvall a 4°C. El sobrenadante se centrifugó durante 90 minutos en el rotor 30 de la ultracentrifuga Spinco L2-50 para sedimentar el fago. El fago así obtenido se resuspendió en un pequeño volumen de diluyente de fago, y se guardó a 4°C.

A los mutantes retrocruzados tres veces se les denomina con su notación habitual seguida de r3.

e) Obtención de antisuero contra  $\phi 29$ .

Una mezcla de 1 ml de diluyente de fago con  $2 \times 10^{11}$  partículas de  $\phi 29$  normal, se mezcló con 1 ml de adjuvante de Freund y se inyectó intraperitonealmente en conejos. Este tratamiento se repitió tres veces con intervalos de una semana. Diez días después de la última inyección, se extrajo la sangre del conejo y se incubó durante 30 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$  para inactivar el complemento, y luego 2 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  para asegurar la coagulación. El suero obtenido se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

f) Preparación de fago marcado radioactivamente.

Para la obtención de  $\phi 29$  marcado radioactivamente se creció B. amyloliquefaciens, estirpe HM, en medio mínimo de Spizizen (Métodos a, 3) hasta una concentración de  $2 \times 10^7$  células/ml. Las bacterias se concentraron por centrifugación en el rotor GSA de la centrifuga Sorvall a 7.500 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en medio mínimo sin glucosa y sin aminoácidos a una concentración de  $2 \times 10^8$  células/ml, y se añadió fago  $\phi 29$  a una multiplicidad de infección de 50 fagos por bacteria. Se incubó durante 5 minutos, al cabo

de los cuales se centrifugó en el rotor SS34 de la centrifuga Sorvall a 10.000 rpm. durante cinco minutos. Las células se resuspendieron en el mismo volumen de medio mínimo completo con los aminoácidos 0,1 mM, y se añadieron 0,5  $\mu\text{C}/\text{ml}$  de Leucina- $\text{C}^{14}$ , 342 mC/mMol. La figura 1 muestra la incorporación de la leucina radioactiva en material insoluble en ácido tricloroacético y, la producción de fago total. Una vez lisado el cultivo se añadieron 500  $\mu\text{gr}/\text{ml}$  de lisozima, 1  $\mu\text{gr}/\text{ml}$  de DNasa y 1  $\mu\text{gr}/\text{ml}$  de RNasa pancreática, incubándose durante 30 minutos a 37°C; a continuación se centrifugó 10 minutos a 10.000 rpm en el rotor SS34 de Sorvall para eliminar restos celulares, y el sobrenadante se centrifugó 2 horas a 28.000 rpm a 4°C en el rotor 30 de la ultracentrifuga Spinco L2-50. El sedimento se resuspendió en 0,5 ml de D.F. y se puso en la parte superior de un gradiente de ClCs por capas de densidades 1.1, 1.3 y 1.5. Se centrifugó 60 minutos a 45.000 rpm a 15°C en el rotor SW50.1 de la ultracentrifuga Spinco L2-50 y se fraccionó el gradiente, contándose la radioactividad presente en cada fracción tomando una alícuota que se precipitó con ácido tricloroacético al 5% (figura 2). Las fracciones que contenían el fago (7-10 de la figura 2), se dializaron frente a DF/2 y se guardaron a 4°C. Las fracciones que contenían ca-

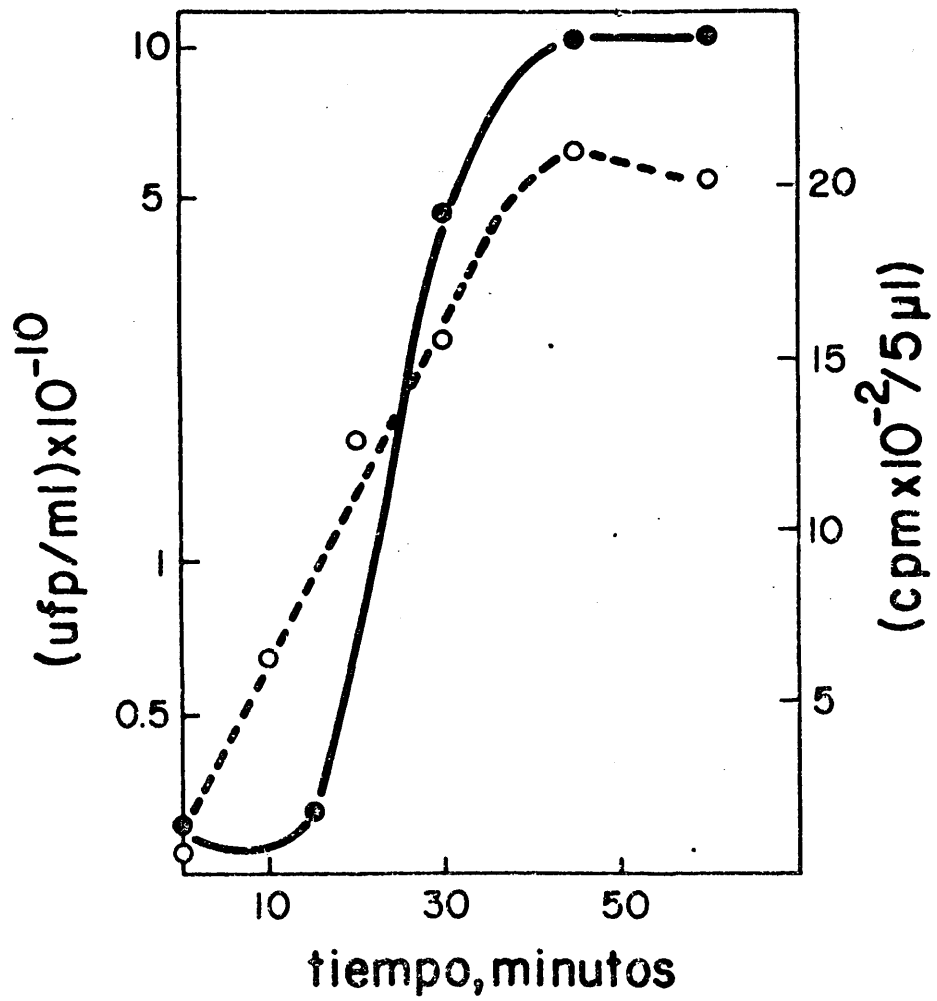


Figura 1. - Desarrollo de fago Ø29 e incorporación de leucina radioactiva. -

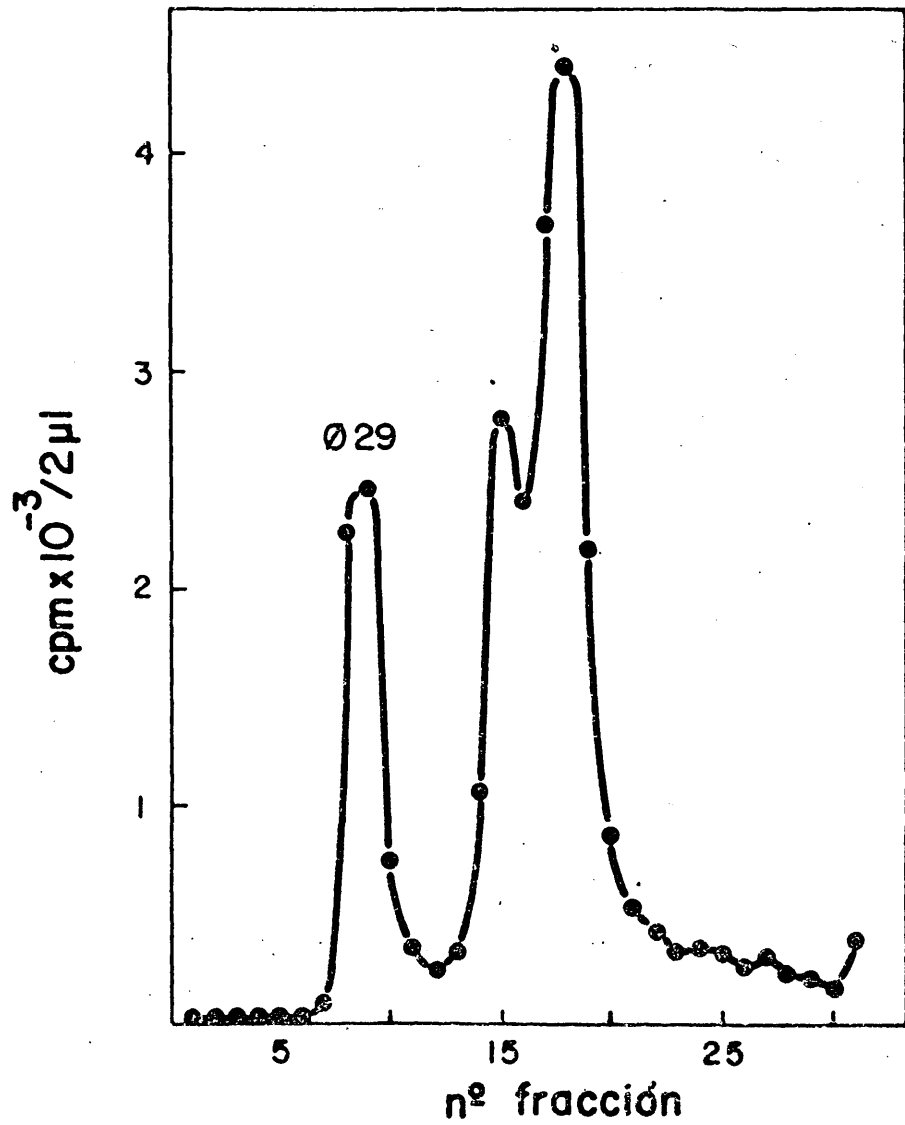


Figura 2. - Gradiente de CICs por capas de las partículas marcadas en B. amyloliquefaciens infectado con Ø29.

bezas vacías de  $\phi$  29 (fracciones 14-16 de la figura 2), se purificaron posteriormente centrifugándose en ClCs de densidad 1,30 gr/ml hasta equilibrio, durante 19 horas a 40.000 rpm en el rotor Ti50 de la ultracentrifuga Spinco L3-50 a 15°C. El gradiente se fraccionó y se contó directamente una alícuota de cada fracción como se describe en Métodos, p (figura 3).

Para preparar fago marcado con  $H^3$ , se realizó el crecimiento de la bacteria B. subtilis 110NA en medio mínimo (Métodos a, 2) hasta una concentración de  $1 \times 10^8$  bacterias/ml. Las bacterias se concentraron por centrifugación, se resuspendieron a una concentración de  $5 \times 10^8$  bacterias/ml en medio mínimo con los 20 aminoácidos 0,5 mM y se infectaron con el fago  $\phi$  29 a una multiplicidad de 20 fagos por bacteria. Se añadieron 10  $\mu$ c/ml de mezcla de aminoácidos- $H^3$  (TRK.440, B5). El tratamiento enzimático posterior y la purificación del fago marcado, se realizó de la misma manera que se ha descrito en el párrafo anterior para el fago marcado con leucina- $C^{14}$ .



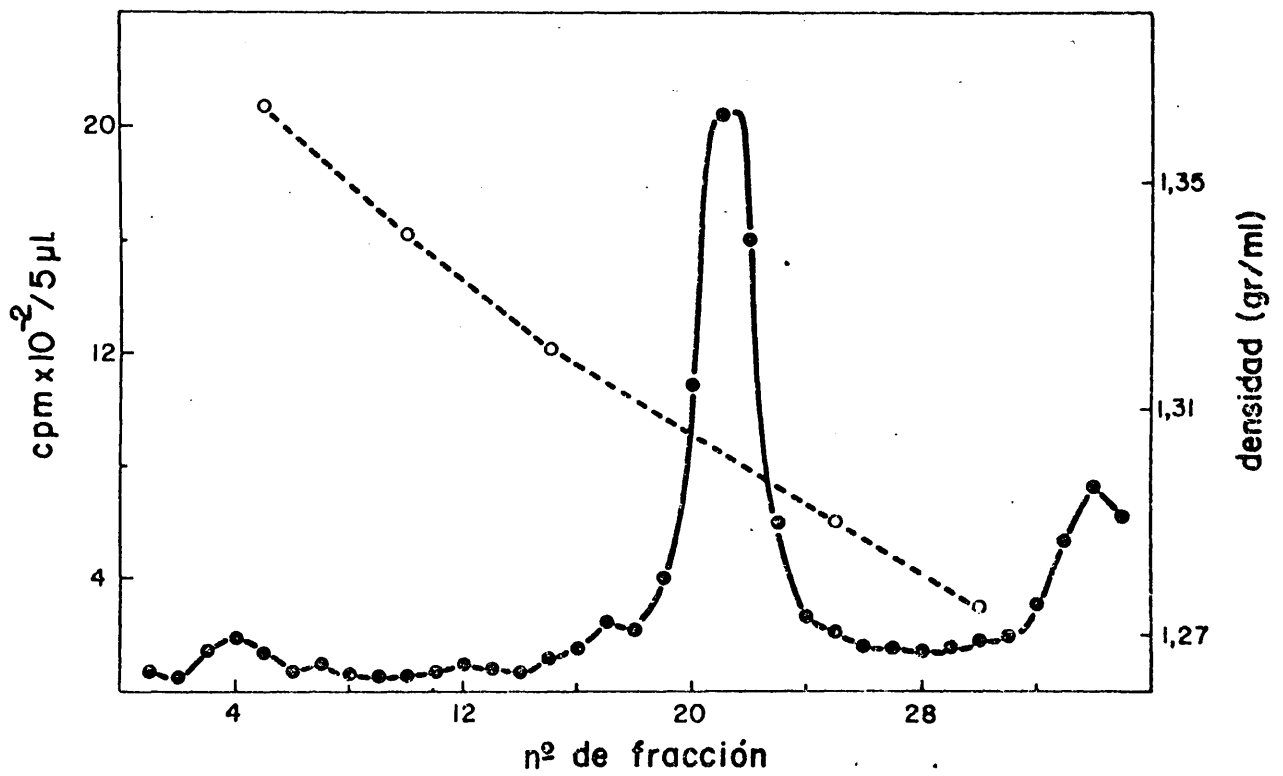


Figura 3.- Purificación de cabezas vacías de  $\emptyset 29$  por centrifugación en CICs hasta equilibrio. -

g) Irradiación de B. subtilis con luz ultravioleta.

1) Efecto de tiempo de irradiación.

B. subtilis 110NA se creció en medio mínimo con 20 aminoácidos (Métodos a, 2) a concentración 0,1 mM cada uno, hasta  $1 \times 10^8$  células por ml de cultivo. Las bacterias se concentraron dos veces mediante centrifugación y resuspensión en el mismo medio sin glucosa y sin aminoácidos. 40 ml de bacterias resuspendidas se irradiaron en una placa Petri (19 cm de diámetro), colocada en un agitador rotatorio durante 2, 4, 6 y 8 minutos, con una lámpara germicida de 15 w colocada a 50 cm sobre la muestra.

Después de la irradiación, las bacterias se concentraron 2,5 veces para obtener una concentración final de  $5 \times 10^8$  bacterias/ml, en un medio que contenía los aminoácidos a concentración 0,5 mM, excepto leucina que se ponía 0,01 mM y se incubaron a 37°C con agitación fuerte. Alícuotas de 0,1 ml de los cultivos irradiados a distintos tiempos, se marcaron con leucina- $H^3$  (20  $\mu$ c/ml, 0.01 mM) desde el minuto 10 al 13, y la

incorporación se paró, añadiendo al cultivo ácido tricloroacético al 5% frío, determinándose la radioactividad total e insoluble en ácido en todos los casos. De igual manera, se marcaron alícuotas de 0,1 ml de cada cultivo desde el minuto 25 al 28.

Como control, una parte de los cultivos irradiados, se infectó con el fago  $\phi$ 29 a una multiplicidad de 15-20 fagos por bacteria y se siguió el desarrollo del fago en las bacterias irradiadas a los distintos tiempos como se indica en Métodos, c. El número final de fagos, dividido por el número de bacterias presentes en el momento de la infección, se tomó como rendimiento de la infección.

2) Incorporación de leucina radioactiva en bacterias infectadas mediante pulsos a lo largo del ciclo de desarrollo del fago.

B. subtilis 110NA se creció en medio mínimo, se concentró y se irradió durante 4,5 minutos como se ha descrito en el apartado g, 1. Después de la irradiación, la bacteria se concentró 2,5 veces (para obtener  $5 \times 10^8$  bacterias/ml) en medio mínimo con los aminoácidos 0,5 mM excepto leucina que se puso 0,01 mM. La bac-

teria se infectó con fago  $\phi$ 29 a multiplicidad de 20 fagos por bacteria y se incubó con agitación a 37°C.

A distintos tiempos se sacaron alícuotas de 1 ml del cultivo infectado y se marcaron con leucina- $H^3$  (25  $\mu$ C/ml, 0,02 mM) durante 3 minutos y, después se añadió un exceso de 100 veces de leucina no radioactiva, continuando la incubación durante 2 minutos más. Como control, bacterias irradiadas y sin infectar se marcaron a los mismos tiempos con leucina- $C^{14}$  (7,5  $\mu$ C/ml, 0,02 mM). Se utilizó 3,3 veces más actividad específica de  $H^3$  que de  $C^{14}$  debido a que la eficiencia de contaje de  $H^3$  es 3,3 veces menor que la de  $C^{14}$ . De esta manera, los resultados obtenidos en bacterias infectadas y sin infectar son comparables cuantitativamente.

Después de las cazas con exceso de leucina no radioactiva las muestras se enfriaron en hielo, y se sedimentaron por centrifugación a 10.000 rpm en el rotor SS34 de la centrifuga Sorvall a 4°C, durante 10 minutos. Cada sedimento se resuspendió a la mitad del volumen original en un tampón que contenía fosfato sódico 0,01M, pH7,2, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,58 mM

y lisozima 500  $\mu\text{gr/ml}$ . La suspensión se incubó a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas, se congeló y descongeló 3 veces y se trató con RNasa pancreática a concentración de 10  $\mu\text{gr/ml}$ , durante 30 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$ . Alícuotas correspondientes a los cultivos infectados y sin infectar se mezclaron y se concentraron a sequedad, para luego resuspender en el tampón de disociación de electroforesis (Métodos m, 1). Como control, para determinar la incorporación de leucina en las células infectadas y sin infectar en los distintos pulsos, las bacterias se marcaron uniformemente con leucina- $\text{H}^3$  (20  $\mu\text{c/ml}$ ) en presencia de leucina 0,01 mM. De esta manera se calculó la actividad específica real de la leucina en cada pulso.

3) Marcaje de las proteínas inducidas en bacterias infectadas: experimentos de pulso y caza.

Las bacterias se crecieron en medio mínimo, se irradiaron con luz ultravioleta durante 6 ó 7,5 minutos y se infectaron como se ha descrito en el apartado anterior. Una alícuota del cultivo sin infectar se guardó como control. A los 22 minutos, una alícuota del cultivo

infectado y otra del cultivo sin infectar se marcaron por adición de leucina- $H^3$  ( $40 \mu\text{C}/\text{ml}$ ;  $0,8 \mu\text{M}$ ); dos minutos después se añadió un exceso de 100 veces de leucina no radioactiva; inmediatamente una alícuota se añadió sobre dos volúmenes de sales congeladas, y las células se sedimentaron por centrifugación a  $10.000 \times g$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Las células se lavaron una vez con 2 volúmenes de sales y se sedimentaron de nuevo. El resto del cultivo marcado con leucina- $H^3$  en un pulso de 2 minutos seguido de caza, se incubó 5 minutos más, al cabo de los cuales las células se lavaron y concentraron como las anteriores. Un control de bacterias infectadas con  $\phi 29$  se marcó con leucina- $C^{14}$  ( $7,5 \mu\text{C}/\text{ml}$ ;  $0,023 \text{ mM}$ ) entre los minutos 21 y 26 después de la infección y se cazaron con un exceso de 100 veces de leucina no radioactiva durante 5 minutos más. Para seguir el desarrollo de fago, se sacaron alícuotas a diferentes tiempos de los cultivos infectados.

4) Preparación de las proteínas marcadas por pulso y caza para electroforesis.

Las células marcadas se resuspendieron en la mitad del volumen original en un tampón de lisis (Tris ClH  $30 \text{ mM}$

pH 6,8, EDTA 1mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,58 mM) y se incubaron con lisozima (280  $\mu$ gr/ml) durante 2,5 horas a 0°C; la muestra se congeló y descongeló 3 veces y se trató con RNasa pancreática (10  $\mu$ gr/ml) durante 30 minutos a 0°C. Para quitar aminoácidos radioactivos residuales, la proteina se precipitó por adición de 10 volúmenes de acetona después de calentar 2 minutos en baño de agua hirviendo en presencia de SDS al 1% y 2-mercaptoetanol al 5% (v/v). La proteina precipitada se secó bajo corriente de nitrógeno.

5) Marcaje de las proteínas inducidas en bacterias infectadas con mutantes sensibles a temperatura.

I) Para el análisis de las proteínas inducidas por mutantes sensibles a temperatura en el cistrón B, las bacterias se irradiaron 7 minutos y se resuspendieron en medio mínimo con los aminoácidos 0,5 mM excepto metionina que estaba a una concentración de 0,01 mM. Las bacterias se dividieron en distintas alícuotas y se infectaron con  $\phi$ 29 normal o con los mutantes sensibles a temperatura en el cistrón B (ts B66, ts B73 y ts B74), a multiplicidad de 20 fagos por bacteria, y se incubaron a 30°C (temperatura permisiva para los mutantes sensibles a tem-

peratura), ó a 42°C (temperatura restrictiva). Los cultivos infectados con los mutantes y las células sin infectar se marcaron con metionina-S<sup>35</sup> (32 µC/ml, 0,17 µM) durante los minutos 15 a 30 después de la infección. Las bacterias infectadas con  $\phi$ 29 normal se marcaron al mismo tiempo con metionina-H<sup>3</sup> (50 µC/ml, 7,8 µM). Después del pulso, las células se añadieron sobre dos volúmenes de sales congeladas, se sedimentaron y se lavaron como se ha indicado (Métodos g, 3).

Como control de la infección se sacaron alícuotas a distintos tiempos para seguir el desarrollo del fago.

La preparación de los extractos para electroforesis se realizó como se ha indicado en el caso de las proteínas marcadas por pulso y caza (Métodos g, 4).

II) Para analizar las proteínas inducidas por los mutantes sensibles a temperatura de los cistrones I y J, se creció B. subtilis 110NA, se irradió 7,5 minutos como se ha descrito (Métodos g, 1) y se resuspendió en medio mínimo con los aminoácidos 0,5 mM, excepto leucina que



estaba a una concentración 0,01 mM. El cultivo se separó en alícuotas que se infectaron con los mutantes ts I810 y ts J116 y se incubaron a 30°C (temperatura permisiva) y a 42°C (temperatura restrictiva). Durante la incubación se siguió el desarrollo de los fagos sacando alícuotas de cultivos a distintos tiempos.

Los cultivos incubados a 30°C infectados con el mutante ts I810, y un control de bacterias irradiadas sin infectar, se marcaron mediante un pulso de leucina-C<sup>14</sup> (5 µC/ml, 0,014 mM), desde el minuto 20 al 28 después de la infección. La incorporación de leucina-C<sup>14</sup> se detuvo añadiendo un exceso de 100 veces de leucina no radioactiva y se incubó dos minutos más, al cabo de los cuales el cultivo se enfrió y se centrifugó para sedimentar las bacterias marcadas (Métodos g, 3). El cultivo incubado a 30°C infectado con el mutante ts J116 y un control de bacterias sin infectar, se marcaron mediante un pulso en idénticas condiciones a las descritas, desde el minuto 40 al 48, se cazó en presencia de leucina no radioactiva dos minutos más, y las bacterias marcadas se sedimentaron como se ha descrito.

Las bacterias incubadas a 42°C e infectadas con el mutante ts I810 así como un control infectado con Ø29 normal y otro de bacterias sin infectar se marcaron con un pulso de leucina-C<sup>14</sup> similar a los ya descritos, desde el minuto 10 al 18 después de la infección, y se cazaron dos minutos más con aminoácido no radioactivo. Otra alícuota del cultivo bacteriano irradiado incubado a 42°C, se infectó con el mutante ts J116 y se marcó mediante un pulso similar a los anteriores desde el minuto 20 al minuto 28 después de la infección, y se cazó dos minutos más con aminoácido no radioactivo. Como control, una alícuota del cultivo bacteriano incubado a 42°C infectado con Ø29 normal y otra alícuota mantenida sin infectar, se marcaron de la misma manera.

Las bacterias marcadas se sedimentaron, se lisaron, y las alícuotas correspondientes a las bacterias infectadas con los mutantes tanto a temperatura permisiva (30°C) como a restrictiva (42°C), así como los controles de bacterias sin infectar e infectadas con Ø29 normal, se precipitaron y se prepararon para electroforesis como se describió en Métodos g, 4.

6) Marcaje de las proteínas inducidas en bacterias infectadas con mutantes sensibles a supresor.

B. subtilis 110NA su<sup>-</sup> se creció en medio mínimo y se irradió con luz ultravioleta durante 7,5 minutos, como se ha descrito en Métodos (g, 1). Las bacterias irradiadas se resuspendieron hasta una concentración de  $5 \times 10^8$  células por ml de medio mínimo completo con los aminoácidos 0,1 mM. El cultivo se dividió en varias alícuotas, que se infectaron con los mutantes sensibles a supresor F515, K91, O56, R629, Q626, J614, G769, A422, E136, H542, B47, I44, L53, L55, M1241, N212, D241 y P112, a una multiplicidad de 20 fagos por bacteria.

Como control, se infectaron alícuotas del cultivo con  $\phi$ 29 normal. La incubación se realizó a 37°C y se siguió el desarrollo de fago en todos los cultivos sacando alícuotas a distintos tiempos, comprobándose que sólo hubo desarrollo normal en el caso de los cultivos infectados con  $\phi$ 29.

A los 5 minutos de incubación, 0,5 ml de cada cultivo se marcaron con 2,5  $\mu$ c de mezcla de aminoácidos-C14

hasta el minuto 13, en el que se añadió al cultivo un exceso de 10 veces de aminoácidos no radioactivos, y se siguió la incubación hasta el minuto 15; a este tiempo los cultivos se centrifugaron para sedimentar las bacterias infectadas, (Métodos g, 3).

A los 20 minutos de incubación, se marcaron otros 0,5 ml de cada cultivo en idénticas condiciones hasta el minuto 28, en el que se añadió el exceso de aminoácidos no radioactivos, y se siguió la incubación hasta el minuto 30. Las bacterias infectadas con los distintos mutantes y el fago Ø29 normal, se sedimentaron y se prepararon para electroforesis como se describe en Métodos(g, 4). En el caso de los mutantes Q626 y M1241, se marcaron las bacterias infectadas en un pulso adicional entre los 35 y 43 minutos.

Como control, se marcaron con aminoácidos radioactivos durante los mismos tiempos cultivos de bacterias irradiadas infectadas con Ø29 normal y sin infectar, y los lisados se prepararon igualmente para electroforesis.

Para estudiar las proteínas determinadas por los genes E y H, B. subtilis 110NA irradiado 7,5 minutos se infectó a una multiplicidad de 20 fagos por bacteria con los mutantes sus E136r3 y sus H542, en medio mínimo (Métodos a, 2) que contenía todos los aminoácidos 0,5 mM excepto leucina 0,01 mM.

Los cultivos infectados con los mutantes se marcaron con leucina-C<sup>14</sup> (7  $\mu$ c/ml, 0,02 mM) desde el minuto 20 al minuto 28 después de la infección. En ese momento, se añadió al cultivo un exceso de 100 veces de leucina no radioactiva, y a los dos minutos los cultivos se enfriaron y se centrifugaron para sedimentar las bacterias marcadas.

Como control, una alícuota del cultivo de bacterias irradiadas se infectó con  $\phi$ 29 normal en las mismas condiciones, y se marcó con leucina-C<sup>14</sup> durante el mismo tiempo. Por otra parte, otra alícuota del cultivo de bacterias irradiadas se mantuvo sin infectar y se marcó con leucina-H<sup>3</sup> (25  $\mu$ c/ml 0,02 mM) al mismo tiempo.

Las bacterias marcadas correspondientes a los distintos cultivos, se resuspendieron en la mitad del volumen original en tampón de lisis, y se lisaron como se describe en Métodos g, 4; la proteína se precipitó y se preparó para electroforesis como se indica en Métodos m, 2.

h) Análisis de péptidos trípticos de proteínas radioactivas.

1) Marcaje de las proteínas y aislamiento.

Las bacterias se crecieron e irradiaron como ya hemos descrito, y se resuspendieron en medio completo a una densidad de  $5 \times 10^8$  células/ml, con los aminoácidos 0,5 mM, excepto metionina que estaba a una concentración 7,5  $\mu$ M.

Las bacterias se infectaron con  $\phi$ 29 a multiplicidad de 20 fagos por bacteria y se incubaron a 37°C. Una alícuota del cultivo se marcó desde los 33,5 a los 35 minutos con metionina- $S^{35}$  (65  $\mu$ c/ml, 0,35  $\mu$ M). Después del pulso, las células se lisaron y prepararon como se ha descrito en el apartado anterior (Métodos, g, 5). Otra

alícuota de las células infectadas se marcó desde los 15 a los 35 minutos con metionina- $H^3$  ( $50 \mu\text{c/ml}$ ,  $7,8 \mu\text{M}$ ), siguiéndose el desarrollo del fago en alícuotas sacadas a distintos tiempos a lo largo de la incubación.

Un control de células sin infectar, se marcó con metionina- $S^{35}$  ó  $H^3$ , respectivamente, como se indicó para las células infectadas.

Las bacterias infectadas con  $\phi 29$ , marcadas con metionina  $S^{35}$  ó  $H^3$  como se indicó en los apartados anteriores, se lisaron y se sometieron a electroforesis en el sistema de pH discontinuo que se describe en Métodos m, 2. Los geles se cortaron en rodajas de  $0,8 \text{ mm}$  y la proteína se eluyó del gel por incubación durante la noche a  $37^\circ\text{C}$  en  $0,5 \text{ ml}$  de SDS  $0,1\%$  y fluoruro de fenilmetil-sulfonilo  $0,58 \text{ mM}$ , después de congelar y descongelar 3 veces. Una alícuota de  $25 \mu\text{l}$  de cada fracción se contó en un contador de centelleo líquido, y las fracciones con radioactividad correspondiente a las proteínas que se iban a analizar, se juntaron y se liofilizaron; el residuo se disolvió en  $1 \text{ ml}$  de agua destilada esteril. Como control, se comprobó que la electroforesis correspondiente a las

células sin infectar, marcadas en las mismas condiciones que las infectadas, no mostraba ningún pico de proteína en la zona que se iba a someter a análisis de péptidos trípticos.

## 2) Análisis de péptidos trípticos.

Una mezcla de las proteínas cuyos péptidos trípticos se querían analizar marcadas con metionina- $S^{35}$  y  $H^3$  se liofilizó y se resuspendió en 1 ml de  $H_2O$ . Se añadieron 0,25 ml de ovoalbúmina (20 mgr/ml) y 0,12 ml de ditioneol 0,64 M, y se incubaron durante 1 hora a  $37^{\circ}C$  (86).

Se añadieron después 0,24 ml de Iodo acetamida 1,08M, y se incubó 1 hora a  $0^{\circ}C$  en la oscuridad. A continuación se añadió 0,625 ml de ácido tricloroacético 100% y se incubó durante 20 minutos a  $0^{\circ}C$ .

El precipitado se centrifugó 20 minutos a 10.000 rpm a  $4^{\circ}C$  en el rotor SS34 de Sorvall y se lavó 3 veces con etanol absoluto a temperatura ambiente. El precipitado se secó a  $60^{\circ}C$  durante 12 horas y se resuspendió en 1 ml de  $CO_3HNH_4$  0,1 M pH 8,3.



A continuación se añadieron cada 3 horas 0,1 ml de Tripsina (1 mgr/ml de ClH 1 mM) durante 48 horas. Las muestras así tratadas se liofilizaron, se resuspendieron en 0,5-1 ml de tampón piridina 0,2M-acético, pH3,1 y se aplicaron a una columna (22 x 0,9 cm) de Beckman PA-35 mantenida a 50°C. La cromatografía se desarrolló bajo presión a un flujo de 1 ml por minuto con un gradiente lineal de 200 ml de piridina 0,2 M-acético, pH3,1 y 200 ml de piridina 2M-acético pH 5,0. Se recogieron fracciones de 2 ml en viales (4,5 x 1,2 cm) que contenían un papel de fibra de vidrio de 2,4 cm de diámetro (Whatman GF/A). Los viales se secaron a 90°C y se contaron como se describe en Métodos p.

i) Preparación del sistema de síntesis de proteínas in vitro de E. coli .

Se siguió el procedimiento descrito por Gold y Schweiger (87).

E. coli K12, estirpe 7, se creció en medio rico (ver Métodos, a 5), hasta 0,8 unidades de absorción óptica a

660 nm. Las bacterias se lavaron 2 veces con tampón A (Tris-ClH 10 mM pH7,5, acetato magnésico 10mM, acetato amónico 22 mM y ditiotreitól 1 mM).

A 6 gr. de bacterias se añadieron 6 ml de tampón A y 24 gr. de esferas de vidrio. La mezcla se trituró en un recipiente refrigerado de un homogenizador Sorvall Omnimixer durante 3-4 minutos a velocidad máxima. Las esferas de vidrio se eliminaron por centrifugación durante 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C en el rotor SS34 de Sorvall. El sobrenadante se centrifugó 20 minutos a 35.000 rpm a 4°C en el rotor Ti 50 de la ultracentrifuga Spinco L2-50, para eliminar restos celulares, y el sobrenadante se centrifugó a 49.000 rpm durante 100 minutos a 4°C en el rotor Ti 50 para sedimentar los ribosomas.

El sobrenadante se pasó por una columna de DEAE-celulosa (2,5 gr. de peso seco), equilibrada con tampón A, a un flujo de 0,5 ml por minuto. La columna se lavó con 25 ml de tampón A, y se eluyó con el mismo tampón con  $\text{ClNH}_4$  0,25M, recogiendo las fracciones del pico de proteína, juntándose (2,85 mgr de proteína por ml), y guardán-

dose en pequeñas alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}.$

Los ribosomas obtenidos se incubaron en un tampón compuesto por ATP 10 mM, 3-fosfoglicerato 0,1M, Tris-ClH 10mM, pH 7,5, acetato magnésico 10mM, cloruro amónico 22 mM y ditiotreitól 1 mM, para degradar el RNA mensajero presente. A continuación, los ribosomas se centrifugaron nuevamente en las condiciones descritas, se resuspendieron en tampón A hasta una concentración de 100 mgr/ml (1500 unidades de densidad óptica a 260 nm, por ml) y se guardaron en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}.$

j) Aislamiento de DNA lineal de  $\phi 29$  para el ensayo in vitro.

Fago  $\phi 29$  a una concentración de 100 unidades de  $A_{260}/\text{ml}$  se incubó 3 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en presencia de 1 mgr/ml de pronasa autodigerida (Materiales, h) y SDS hasta una concentración final de 0,1%; al cabo de este tiempo se añadió nuevamente la misma cantidad de pronasa autodigerida y se siguió incubando 3 horas más. La mezcla se diluyó cinco veces con Tris-ClH 0,1M pH 7,8 y se extrajeron las proteínas a temperatura ambiente con

un volumen igual de fenol destilado equilibrado en el tampón anterior, agitando la mezcla suavemente, para evitar la rotura del DNA, durante unos minutos a temperatura ambiente (88). Las dos fases se separaron por centrifugación a temperatura ambiente en el rotor SS34 de la Sorvall durante 5 minutos a 5.000 rpm. La fase acuosa se reextrajo con fenol de la misma forma dos veces más, y el conjunto de fases fenólicas se reextrajo con un volumen igual al original de Tris-ClH 0,1M, pH 7,8. Las fases acuosas se juntaron y dializaron contra dos litros de 1xSSC estéril durante 24 horas. El DNA así obtenido, se analizó por un gradiente neutro de sacarosa entre el 5 y el 20% (peso/volumen) en un tampón Tris-ClH 50 mM pH 7,8, EDTA 10mM y ClNa 1M. La sedimentación se realizó durante 2,5 horas a 48.000 rpm a 4°C, en el rotor SW50,1 en la ultracentrifuga L250 (figura 4).

Para comprobar el grado de rotura en una de las bandas del DNA, éste se analizó también en un gradiente alcalino de sacarosa del 5 al 20% (peso/volumen) en un tampón Tris-ClH 50 mM pH 7,8, EDTA 10mM, ClNa 0,9M y NaOH 0,1M. Las condiciones de sedimentación fueron idénticas a las empleadas en el caso del gradiente neutro (figura 5).

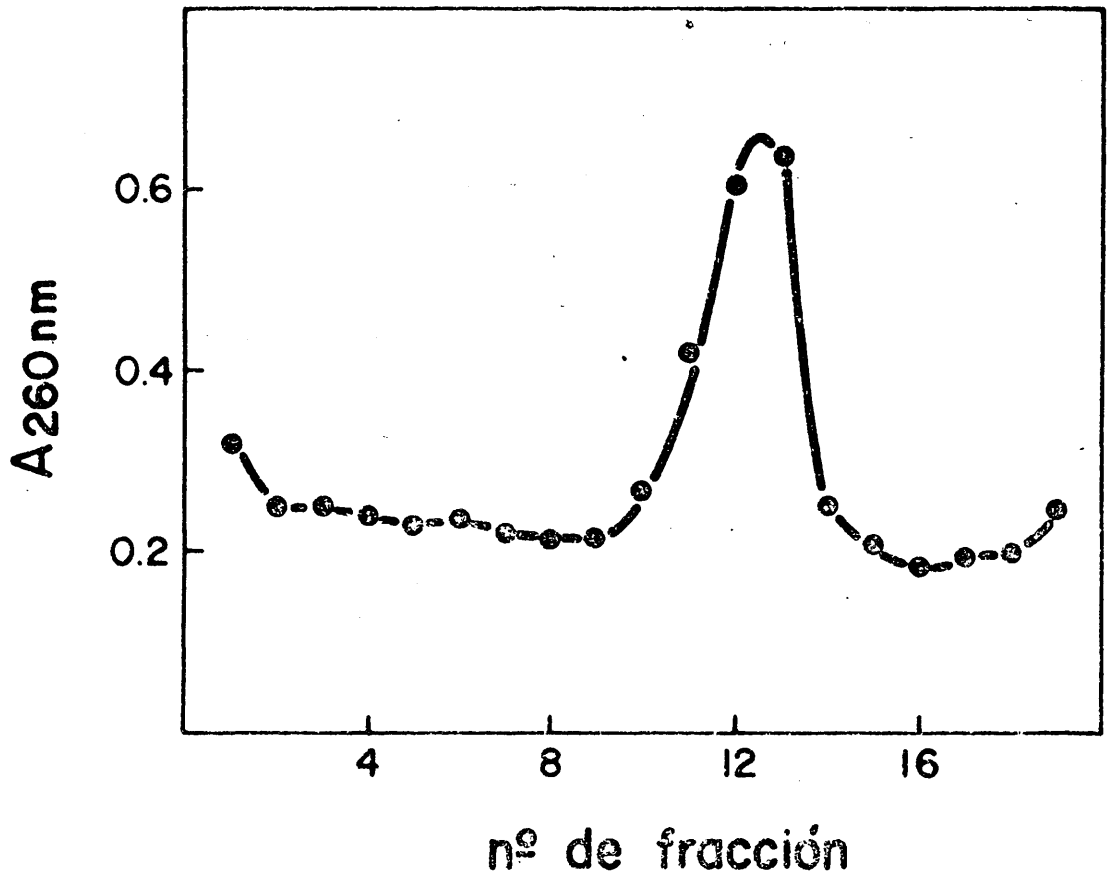


Figura 4. - Gradiente neutro de sacarosa del DNA de  $\phi 29$ .

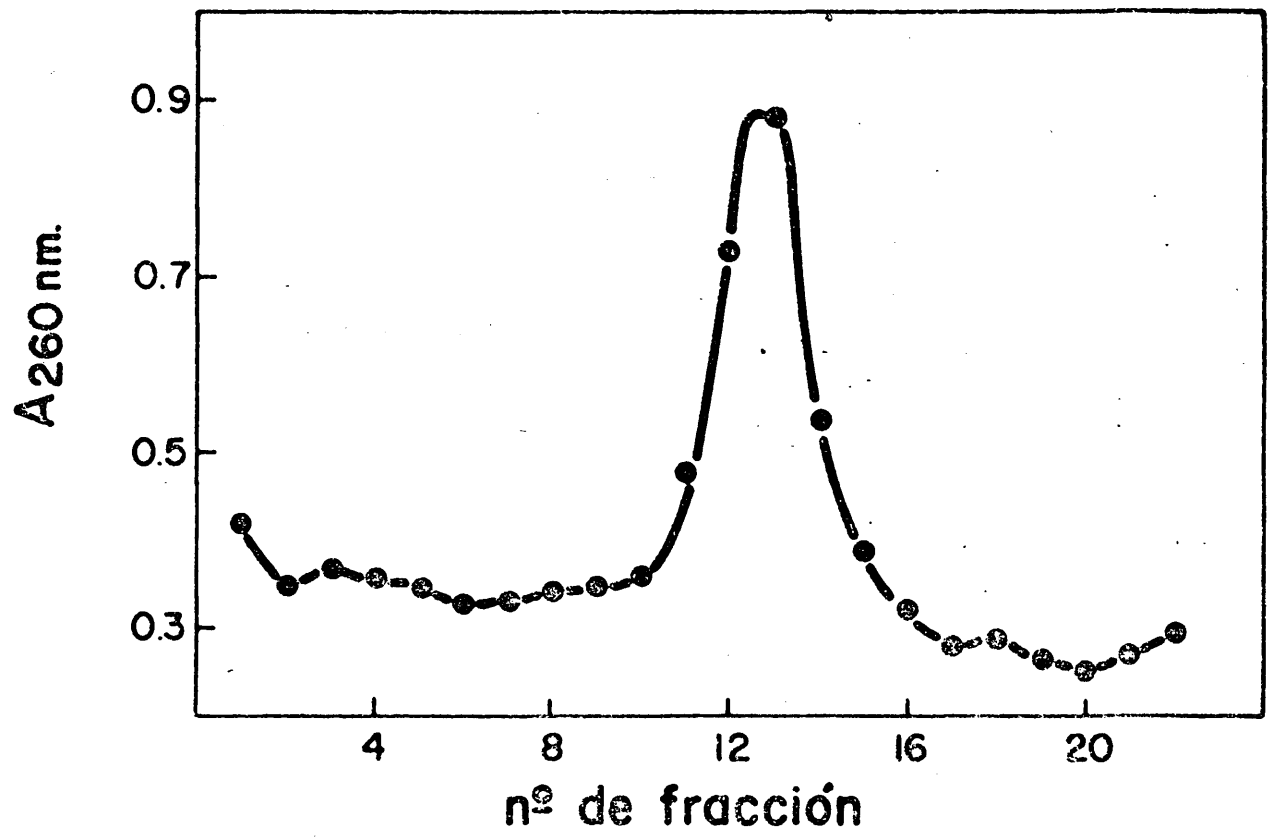


Figura 5.- Gradiente alcalino de sacarosa del DNA de  $\phi 29$ .-

k) Ensayo de síntesis de proteínas y RNA en el sistema in vitro de E. coli .

1) Método de ensayo. -

La mezcla de incubación contenía, en un volumen de 0,1 ml, los siguientes componentes: Tris-ClH 50 mM pH8, acetato potásico 50 mM, ditiotreitól 2mM, ATP 2mM, CTP, GTP y UTP 0,5 mM cada uno, fosfoenolpiruvato 20mM, leucovorin cálcico 0,31 mM, 19 aminoácidos (menos leucina) 0,2 mM cada uno, 100  $\mu$ gr de tRNA de E. coli B, 500  $\mu$ gr de ribosomas de E. coli K12, 0,04 ml de fracción proteica purificada por DEAE-celulosa y 5  $\mu$ gr de DNA lineal de  $\phi$ 29. La concentración de  $Mg^{++}$  se ajustó a 14,5 mM con acetato magnésico.

La incubación se realizó a 37°C, añadiendo a la mezcla de ensayo leucina- $C^{14}$  ó  $H^3$  como se indica en cada caso.

Para seguir la incorporación de leucina radioactiva en proteínas, se añadió leucina- $H^3$  (4  $\mu$ c/ml, 0,05mM) y a distintos tiempos se sacaron alícuotas de 25  $\mu$ l, que se calentaron durante 15 minutos a 90°C antes de filtrar y contar como se describe en Métodos (p).

La preparación de proteínas marcadas para análisis por electroforesis, se realizó añadiendo a la mezcla de incubación leucina- $C^{14}$  (15  $\mu\text{c/ml}$ , 0,05 mM). Después de 17,5 minutos de incubación, se añadió un exceso de 100 veces de leucina no radioactiva, continuando la incubación 2,5 minutos. Como control, las proteínas sintetizadas en un ensayo sin DNA, se marcaron con leucina- $H^3$  (50  $\mu\text{c/ml}$ , 0,05 mM) en las mismas condiciones.

La incorporación de UTP en RNA, se siguió utilizando un ensayo similar al descrito, con los 20 aminoácidos 0,2 mM, y se añadió UTP- $H^3$  (20  $\mu\text{c/ml}$ , 0,5 mM). Se tomaron alícuotas de 25  $\mu\text{l}$  a distintos tiempos, se precipitaron con ácido tricloroacético frío al 5%, y se contaron como se describe en Métodos, p.

## 2) Preparación de las proteínas sintetizadas in vitro para electroforesis.

Alícuotas marcadas con leucina radioactiva de los ensayos de síntesis in vitro dirigidos por el DNA de  $\phi 29$ , y sin DNA respectivamente, se trataron con RNasa pancreática (10  $\mu\text{gr/ml}$ ) durante 1 hora a  $0^{\circ}\text{C}$ . Después se precipitaron



con ácido tricloroacético al 10% durante 15 minutos a 0°C, y las proteínas precipitadas se sedimentaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos en el rotor SS34 de la centrifuga Sorvall, a 4°C. El sedimento se lavó una vez con etanol-eter 1:1 (vol/vol), y dos veces con etanol-eter 1:3 (vol/vol). El precipitado lavado se secó bajo corriente de nitrógeno.

La disociación de las proteínas para electroforesis se realizó como se describe en Métodos m, 1.

1) Ensayo de actividad lisozima.

1) Preparación de filtros marcados radioactivamente.

La determinación de la actividad enzimática se basa en la liberación de radioactividad de filtros de papel Whatman 3MM que tienen adsorbido E. coli marcado con ácido  $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélico- $H^3$ . La preparación de filtros se realizó según el método de Gold y Schweiger (87). Las bacterias radioactivas se prepararon creciendo E. coli c en 10 ml de medio completo (Métodos a., 4), en presencia de 100  $\mu$ c de ácido  $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélico- $H^3$  (1 mc/ml, 200  $\mu$ c/  $\mu$  Mol), incubándose a 37°C con agitación hasta que el cultivo bacteriano alcanzó fase estacionaria. La fi-

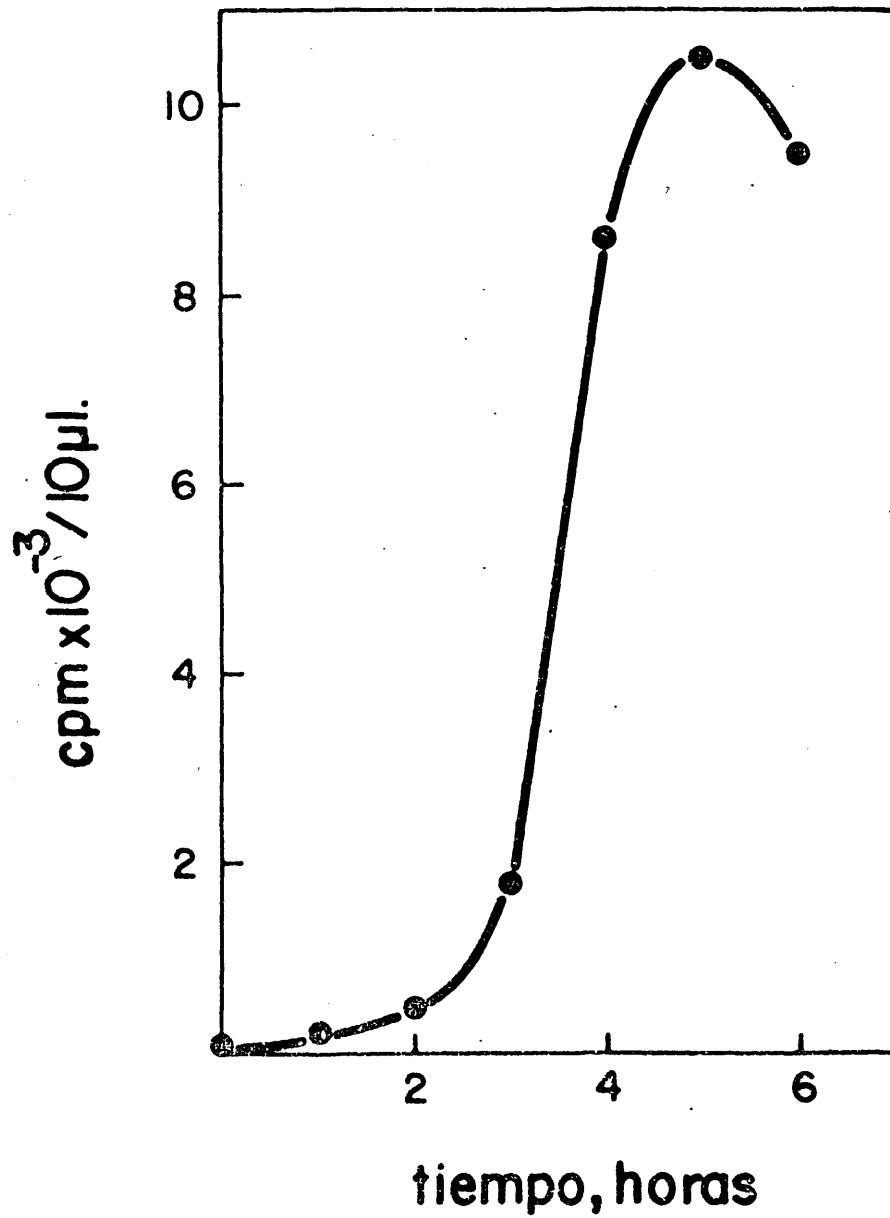


Figura 6. - Incorporación de ácido  $\alpha, \epsilon$ , diaminopimélico- $H^3$  en *E. coli* . -

gura 6 muestra la incorporación de la radioactividad en material insoluble en ácido tricloroacético al 5%.

Se distribuyeron alícuotas de 0,1 ml del cultivo en filtros Whatman 3 MM (de 2,4 cm. de diámetro). Los filtros se lavaron con 2,5 ml de ácido tricloroacético al 10% durante 4 horas agitándose suavemente, luego dos veces con ácido tricloroacético al 5% durante 10 minutos y una vez con etanol:éter (1:1) durante 10 minutos. Los filtros se hirvieron durante 10 minutos en acetato amónico 0,1 M y se lavaron dos veces con acetato amónico frío, secándose a continuación con papel de filtro. Los filtros marcados, que tenían retenidas entre 80.000 y 100.000 cpm. cada uno después del proceso, se conservaron a 4°C.

## 2) Métodos de ensayo.

A los tiempos indicados en los experimentos, se sacaron alícuotas de 50  $\mu$ l de los ensayos de síntesis de proteínas in vitro, y se añadieron a viales conteniendo un filtro con E. coli marcado con ácido  $\alpha, \epsilon$ -diaminopimélico- $H^3$  y 0,5 ml de acetato amónico 0,1 M.

Los filtros se incubaron 4 horas a 37°C, al cabo de las cuales se recogió el sobrenadante, se añadió a un filtro de papel Whatman GF/A, y se secaron a 60-80°C. Luego se contaron como se describe en Métodos, p.

Como control, se tomaron alícuotas de las proteínas sintetizadas in vitro en ausencia de DNA, y se valoraron igualmente.

Como control de que la actividad sintetizada en el ensayo no era proteasa, se pretrataron los filtros marcados con  $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélico con lisozima de clara de huevo (60  $\mu$ gr/0,5ml de acetato amónico 0,1M). Una vez liberada del filtro toda la radioactividad susceptible a la acción de la lisozima (un 40% de la radioactividad total del filtro) los filtros se cambiaron de medio y se incubaron con un enzima proteolítico (tripsina, 60  $\mu$ gr/0,5 ml de acetato amónico 0,1M). La tabla I muestra que en estas condiciones se libera aproximadamente otro 40% de la radioactividad total presente en el filtro antes del tratamiento con los enzimas.

TABLA I. ENSAYO DE ACTIVIDAD PROTEASA EN FILTROS CON E. coli MARCADO CON ACIDO  $\alpha$ - $\epsilon$ , DIAMINOPIMELICO-H<sup>3</sup>

| Tiempo de tratamiento | a) cpm liberadas por<br>lisozima/100 $\mu$ l | b) cpm liberadas por<br>tripsina/100 $\mu$ l |
|-----------------------|--|--|
| 0 min.                | 29   | 160  |
| 15 "                  | 1350   | 1036   |
| 30 "                  | 2470   | 1960   |
| 45 "                  | 2870   | 2535   |
| 60 "                  | 2905   | 2970   |

Filtros de papel Whatman 3MM conteniendo E. coli marcado con ácido  $\alpha$ , $\epsilon$ -, diaminopimélico-H<sup>3</sup>, preparados como se ha descrito en Métodos 1,1, se trataron (a) con lisozima (60  $\mu$ gr/0,5 ml de acetato amónico 0,1 M). Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados, y se contó la radioactividad total liberada como se describe en Métodos, p. A los 60 minutos los filtros se cambiaron de medio, y se incubaron (b) con tripsina (60  $\mu$ gr/0,5 ml de acetato amónico 0,1 M). Se sacaron alícuotas a los tiempos indicados y se contó la radioactividad total liberada.

De igual manera, alícuotas tomadas a distintos tiempos de incubación de un ensayo de síntesis de proteínas in vitro dirigido por el DNA de  $\phi 29$ , se incubaron con filtros pre-tratados con lisozima (es decir, que habían liberado toda la radioactividad susceptible a la acción de la lisozima), para seguir la liberación adicional de radioactividad.

Una unidad de lisozima, se define como la actividad de enzima capaz de liberar 1 cpm por minuto de incubación a 37°C (89).

m) Electroforesis en geles de poliacrilamida.

1) Sistema de pH continuo.

Las muestras de proteína precipitada se disolvieron en 0,2 ml de tampón de disociación (fosfato sódico 5 mM pH7,1, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 1% (v/v) y urea 8M) y se calentaron 3-5 minutos en un baño de agua hirviendo.

Se utilizaron geles de 15 cm. de longitud y 0,55 cm de diámetro. La solución del gel contenía acrilamida 12,5%, N-N', metilenbisacrilamida 0,6%, urea 6M (90)  $\text{PO}_4\text{Na}$  0,05M pH7,2, SDS 0,1% (9) y tetrametiletildiamina 0,05% (vol/vol). Los geles se polimerizaron con 1/100 (vol/vol) de persulfato amónico 15 mgr/ml.

El electrolito utilizado contenía fosfato sódico 0,05M pH7,2 y SDS 0,1%.

La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante 12 horas, a una intensidad constante de 5 mA/gel.

Los geles se cortaron en fracciones de 1mm. con un cortador de geles Mickle y las fracciones se pusieron en viales, a los que se añadió 0,25 ml de SDS 0,1%. Los viales se congelaron y descongelaron 3 veces, y se incubaron durante la noche con agitación suave a 37°C, para eluir la proteína del gel.

La radioactividad presente en cada vial se determinó como se describe en Métodos, p, poniendo en cada vial un papel de fibra de vidrio Whatman GF/A de 2,5 cm de diámetro, y secando lentamente entre 70 y 90°C.

## 2) Sistema de pH discontinuo.

Las muestras de proteína precipitada, se disolvieron en 0,2 ml de tampón de disociación, que contenía Tris-ClH 0,0625 M, pH 6,8, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5% y urea 6M, y se calentaron de 3 a 5 minutos en un baño de agua hirviendo.

Se utilizaron geles de 10 cm de longitud y 0,55 cm. de diámetro siguiendo el sistema descrito por Laemmli (49). El gel de separación contenía acrilamida 10%, N-N'-metilenbisacrilamida 0,25%, Tris-ClH 0,325 M pH 8,8, SDS 0,1% y tetrametilendiamina 0,05%, y se polimerizó con un volumen 1/100 de persulfato amónico (37,5 mgr/ml).



El gel de concentración contenía acrilamida 3%, N-N'-metilenbisacrilamida 0,25%, Tris-ClH 0,125 M pH6,8, SDS 0,1% y tetrametilendiamina 0,1%, y se polimerizó como el gel de separación.

El electrolito utilizado era Tris 0,025M, glicina 0,192M, ajustado a un pH de 8,6, conteniendo SDS al 0,1%.

Las electroforesis se llevaron a cabo a 90 voltios durante 6,5 horas (ó como se indica en cada caso). Los geles se cortaron en fracciones de 0,8-1mm como se indica en cada caso y se sometieron al proceso descrito en m,1 para eluir la proteína del gel.

Para analizar las proteínas sintetizadas por los mutantes sus E136 y sus H542, se realizó una modificación en los geles: el gel separador se preparó a partir de dos soluciones de acrilamida una del 10% y otra del 20% siendo el resto de los componentes como se ha descrito antes. Estas soluciones se mezclaron en un formador de

gradientes lineal, y se polimerizaron como se describe en Métodos m, 3. El gel de concentración y el electrolito utilizado fueron los ya descritos en este apartado.

Los geles se corrieron a 1,5 mA/gel durante 14 horas, y después se cortaron en rodajas de 1 mm y se eluyó la proteína como se describe en este apartado.

### 3) Electroforesis en placa y autorradiografía.

Las muestras se disolvieron en 75  $\mu$ l de tampón que contenía Tris-ClH 0,0625M pH6,8, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5% y urea 6M, y se calentaron 3-5 minutos en baño de agua hirviendo.

Las placas de gel se formaron en un aparato de Hoefer Scientific Instruments de 30 cm de longitud y 14 de anchura. Se utilizaron los espaciadores de 1,5 mm de grueso.

El gel de separación se preparó a partir de las siguientes soluciones:

i) Tris-ClH 0,325 M pH8,8, acrilamida 10%, N-N'-metilenbisacrilamida 0,25%, SDS 0,1%, tetrametiletildiamina 0,05%, y se añadió 1/200 (vol/vol) de persulfato amónico 25 mgr/ml para que polimerizara el gel.

ii) Idéntica a la anterior pero con acrilamida al 20%, y N-N'-metilenbisacrilamida 0,33%. Cada solución fría, se colocó en las cubetas de un formador de gradientes lineales, y la mezcla se bombeó en el aparato de electroforesis desde abajo.

El gel de concentración utilizado fue el mismo que el descrito en Métodos (m, 2). Antes de polimerizar el gel de concentración se insertó en el aparato un peine formador de cámaras, que se retiró cuando finalizó la polimerización. Las dimensiones de las cámaras para las muestras eran de 4 mm de largo por 1,5 mm de ancho, separadas por espacios de 2,5 mm.

El electrolito utilizado fue el mismo que el descrito en Métodos (m, 2).

La electroforesis se llevó a cabo durante 15 horas a una intensidad constante de 20 mA por placa.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron como se describe en Métodos(ñ) o se secaron mediante una modificación del método de Fairbanks<sup>3</sup> (92). Para ello, se colocó debajo del gel una lámina de Handy Wrap, y en la parte superior se colocó papel Whatman 3MM y una tela de acero inoxidable. El gel así preparado se colocó entre dos láminas de caucho de silicona, una de las cuales tenía un orificio que se conectó a una bomba de vacío, y se colocó sobre una placa calefactora a 150°C, hasta que se secó (1-2 horas).

El gel seco se puso en contacto con la película Kodirex los tiempos indicados en cada caso en completa oscuridad. La película se reveló con revelador rápido para Rayos X durante 3-5 minutos y se fijó con fijador rápido para uso radiográfico durante 5 minutos.

Para realizar la densitometría de las placas de película de autorradiografía, se cortaron en tiras de apro-

ximadamente 1 cm. de anchura, y se midieron en el densitómetro Chromoscan MKII, a una longitud de onda entre 610 y 690 nm.

n) Recristalización de los reactivos para electroforesis.

Se realizó según el método descrito por Loening (93),

1) Acrilamida: Setenta gramos de acrilamida se disolvieron en 1 litro de cloroformo a 50°C y la disolución se filtró por papel. El filtrado, se dejó a -15°C durante 12 horas y los cristales se recogieron por filtración y se secaron en vacío.

2) N,N'-metilenbisacrilamida: Diez gramos de N,N'-metilenbisacrilamida se disolvieron en 1 litro de acetona a 45°C. La suspensión se filtró por papel, y el filtrado se dejó a -15°C durante 12 horas. Los cristales se recogieron por filtración y se secaron en vacío.

3) Dodecilsulfatosódico: Se añadieron sesenta gramos de SDS a 2 litros de etanol 97% en ebullición, y se filtraron en caliente. El filtrado se dejó 12 horas a temperatura ambiente y los cristales de SDS se recogieron por filtración y se secaron por liofilización.

ñ) Tinción de proteínas en geles.

Se utilizó el método de Fairbanks y col. (94). Los geles, se pusieron en una solución de isopropanol 25% ácido acético 10% y azul brillante de Coomassie R-250 al 0,025%, y se mantuvieron en ella durante la noche, con agitación ocasional. Después, se pasaron a una solución de isopropanol 10%, ácido acético 10% y azul brillante de Coomassie R-250 al 0,0025%, donde se agitaron durante 6 horas. El gel parcialmente desteñado, se pasó a una solución de ácido acético 10% con azul brillante de Coomassie R-250, 0,0025% durante la noche; luego se terminaron de desteñir y se conservaron en ácido acético al 10% .

o) Determinación del peso molecular de los polipéptidos inducidos por Ø29.

Se corrieron proteínas disociadas de peso molecular conocido en geles paralelos (Métodos m, 1) determinándose su movilidad relativa (95). Los marcadores utilizados fueron (además de las proteínas estructurales de Ø29 marcadas con leucina-C<sup>14</sup> las siguientes: seroalbúmina bovina (peso molecular 68.000), inmunoglobulina G, cadena pesada (peso molecular 55.000), quimotripsinógeno (peso molecular 25.000), mioglobina (peso molecular 17.200), citocromo c (peso molecular 12.300) y los péptidos obtenidos del citocromo c tratado con bromuro de cianógeno según el método descrito por Gross (96): 1,2 mgr de citocromo c se disolvieron en 0,5 ml de ácido fórmico 70%, y se añadió un cristal de bromuro de cianógeno. La mezcla se mantuvo a 40°C durante 24 horas en oscuridad, se liofilizó y se resuspendió en 0,1 ml de agua destilada esteril. Los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos son 7760, 2780 y 1810 respectivamente.

El peso molecular del precursor de la proteína NP1, se determinó en geles de pH discontinuo (Métodos m, 2), utilizando como marcadores las proteínas estructurales del fago Ø29, y fosforilasa a (peso molecular 92.500).

Las proteínas se tiñeron como se describe en Métodos, n.

p) Determinación de radioactividad.

La determinación de radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5%, se realizó por precipitación durante 15 minutos, seguida de filtración a 4°C a través de discos de fibra de vidrio (Whatman GF/C de 2,5 cm de diámetro). Los filtros se lavaron con ácido tricloroacético al 5% frío y se metieron en pequeños viales (4,5 x 1,2 cm), para secarlos en estufa a 120°C durante 1 hora.

A los viales con los filtros secos, se les añadieron 3 ml de líquido de centelleo (4 gr de butil-PBD por litro de tolueno, ó 50 mgr de dimetil POPOP y 4 gr de PPO por litro de tolueno), y se contaron en contadores de centelleo líquido Packard Tricarb o Nuclear Chicago.

La radioactividad total se determinó aplicando la alícuota que se quería contar a un papel de fibra de vidrio (Whatman GF/A de 2,5 cm. de diámetro), y secando en estufa a 90-120°C. A continuación, se añadió el líquido de centelleo, y se contaron en los contadores antes mencionados.



q) Determinación de proteínas.-

Se utilizó el método de Lowry y colaboradores (97). Para ello se prepararon cuatro soluciones:

A) Carbonato sódico 2%; B) sulfato de cobre 0,5% en tartrato sódico-potásico al 1%; C) solución B con 50 volúmenes de solución A; D) reactivo de Folin 50%.

El problema cuyo contenido en proteína se quería determinar, se diluyó hasta 0,1 ml en NaOH a una concentración final de 1M, y se añadió 0,25 ml de solución C; después de 10 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 25  $\mu$ l de solución D, agitándose inmediatamente, y la mezcla se mantuvo 20 min. a temperatura ambiente, determinándose finalmente su absorción a 670 nm.

Como patrón se utilizó una solución de seroalbúmina bovina cuya cantidad de proteína se había determinado por su coeficiente de absorción molar.

IV. RESULTADOS

a) Efecto de la luz ultravioleta sobre B. subtilis 110NA.

Para estudiar el efecto de distintas dosis de irradiación con luz ultravioleta en B. subtilis 110NA, las bacterias se irradiaron durante 2, 4, 6 y 8 minutos. Las bacterias irradiadas se marcaron con leucina radioactiva a dos tiempos diferentes: de 10 a 13 minutos y de 25 a 28 minutos después de iniciada la incubación de las bacterias irradiadas.

La tabla II muestra los resultados de la incorporación de leucina radioactiva en material insoluble en ácido tricloroacético al 5% en células irradiadas durante los distintos tiempos.

La irradiación de dos minutos hace disminuir unas 2 veces la incorporación de leucina radioactiva en el pulso de 10 a 13 minutos; en el de 25 a 28 minutos apenas detiene la incorporación. La irradiación de 4 minutos produce un descenso en la incorporación del aminoácido radioactivo de 4 veces en el pulso de 10 a 13 minutos, y casi de 2 veces en el de 25 a 28 minutos

TABLA II. EFECTO DE LA IRRADIACION DE B. SUBTILIS 110NA CON LUZ ULTRAVIOLETA A DISTINTAS DOSIS.

| <u>Tiempo de irradiación</u> | a)<br><u>% Incorporación pulso 10—13</u> | b)<br><u>% Incorporación pulso 25—28</u> | c)<br><u>Fago final (ufp) por bacteria</u> |
|------------------------------|--|--|--|
| 0 min.                       | 54,6                                     | 44,8                                     | 152  |
| 2 min.                       | 28,9                                     | 35,6                                     | 200  |
| 4 min.                       | 13,7                                     | 23,5                                     | 86 <sup>a</sup>                            |
| 6 min.                       | 5,1                                      | 3,7                                      | 40   |
| 8 min.                       | 3,7                                      | 2,8                                      | 36   |

B. subtilis 110NA , se creció y se irradió con luz ultravioleta como se describe en Métodos, durante 2, 4, 6 y 8 minutos. (a) alícuotas de 0,1 ml del cultivo se marcaron con leucina- $H^3$  (20  $\mu$ c/ml, 0,01 mM) del minuto 10 al 13, y la incorporación se detuvo añadiendo ácido tricloroacético al 5%. La radioactividad se determinó como se ha descrito en Métodos b. De igual manera, se marcaron las células del minuto 25 al minuto 28. El porcentaje de incorporación representa el tanto por ciento de la radioactividad total añadida al cultivo, que se incorporó durante el pulso en radioactividad insoluble en ácido.

Una alícuota de los cultivos irradiados se infectó con fago  $\phi$ 29 como se describe en Métodos, para ver el desarrollo del fago en las bacterias irradiadas, y calcular el número de fagos obtenidos por bacteria infectada (c).

sobre el control de células sin irradiar.

La irradiación durante 6 minutos produce 11 veces menos incorporación en el pulso de 10 a 13 minutos, y más de 12 veces menos incorporación en el pulso de 25 a 28 minutos, respecto a los controles sin irradiar, mientras que la irradiación de las bacterias por más tiempo (8 minutos), no produce descenso adicional considerable de la incorporación del aminoácido radioactivo.

Una alícuota de los cultivos irradiados a los distintos tiempos, se infectó con el fago  $\phi 29$ , calculándose el rendimiento, al tiempo de lisis, de los fagos obtenidos por bacteria infectada. La irradiación de las bacterias durante 4 minutos hace disminuir a la mitad el rendimiento de fagos/bacteria sobre el control sin irradiar; la disminución es de cuatro veces en las células irradiadas 6 minutos. Irradiaciones durante más tiempo no afectan apreciablemente el rendimiento de fagos obtenidos por bacteria.

b) Proteínas inducidas en B. subtilis 110NA irradiado e infectado con el fago  $\phi 29$ .

B. subtilis 110NA irradiado 4,5 minutos con luz ultra-

violeta, se infectó con  $\phi 29$ , y a distintos tiempos se marcaron las bacterias infectadas con leucina- $H^3$  (pulsos de 3 minutos), llevando como control bacterias no infectadas marcadas a los mismos tiempos con leucina- $C^{14}$ .

La figura 7 muestra el desarrollo del fago  $\phi 29$  en bacterias irradiadas, siendo el rendimiento final de 60 unidades formadoras de placa por bacteria infectada. La relación de incorporación de leucina radioactiva que se muestra en la figura 7, indica que después del primer pulso (de 0 a 3 minutos), la bacteria infectada incorpora radioactividad en material insoluble en ácido en mayor proporción que la no infectada (hasta dos veces más en el pulso de 25 a 28 minutos).

Los nmoles de aminoácido incorporados, se calcularon a partir de la actividad específica real del aminoácido radioactivo en el momento que se dió el pulso. Para ello se tuvo en cuenta la corrección de la actividad específica debida al consumo de la leucina presente en el medio de incubación en cada momento. Este cálculo se realizó siguiendo la incorporación de aminoá-

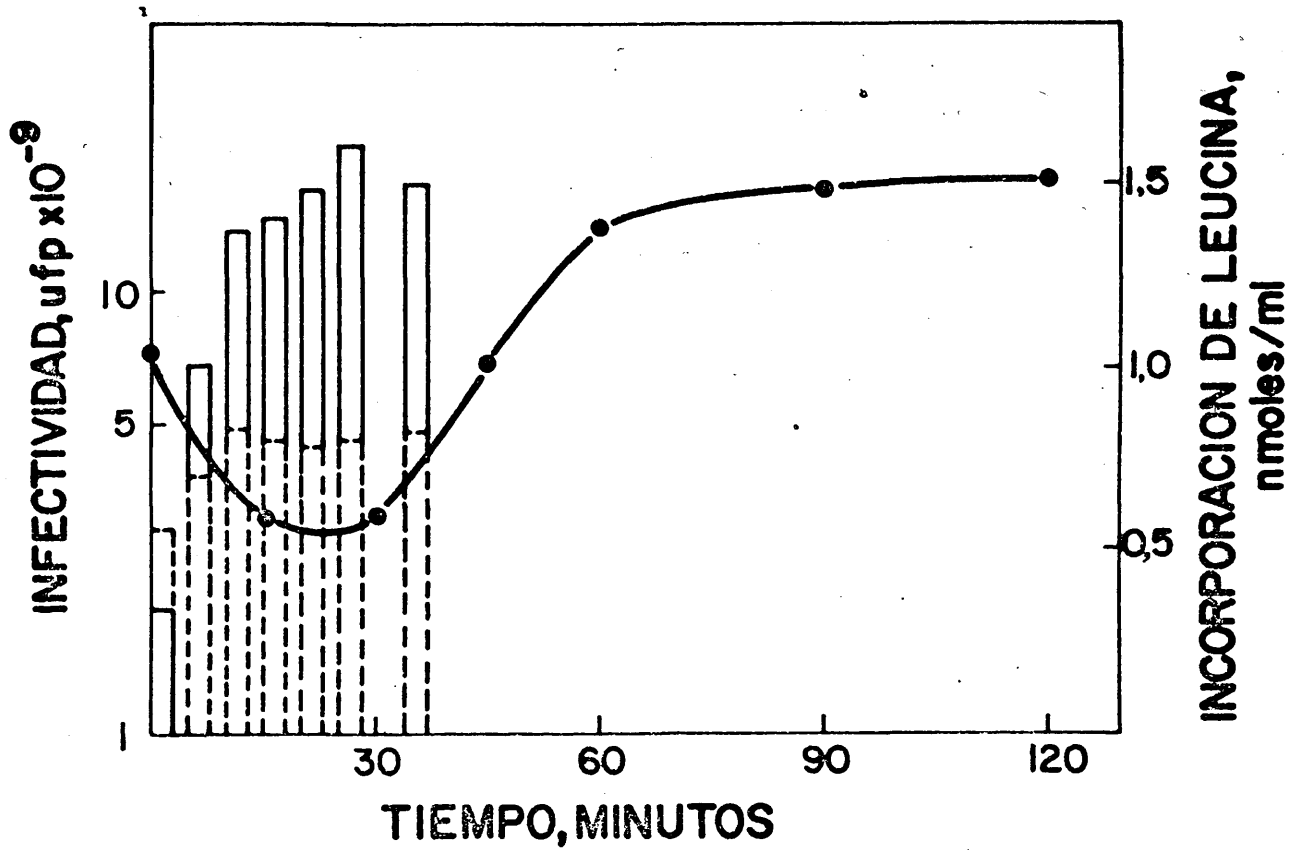


Figura 7. - Incorporación de leucina radioactiva y desarrollo de  $\phi 29$  en B. subtilis irradiado con luz ultravioleta. -

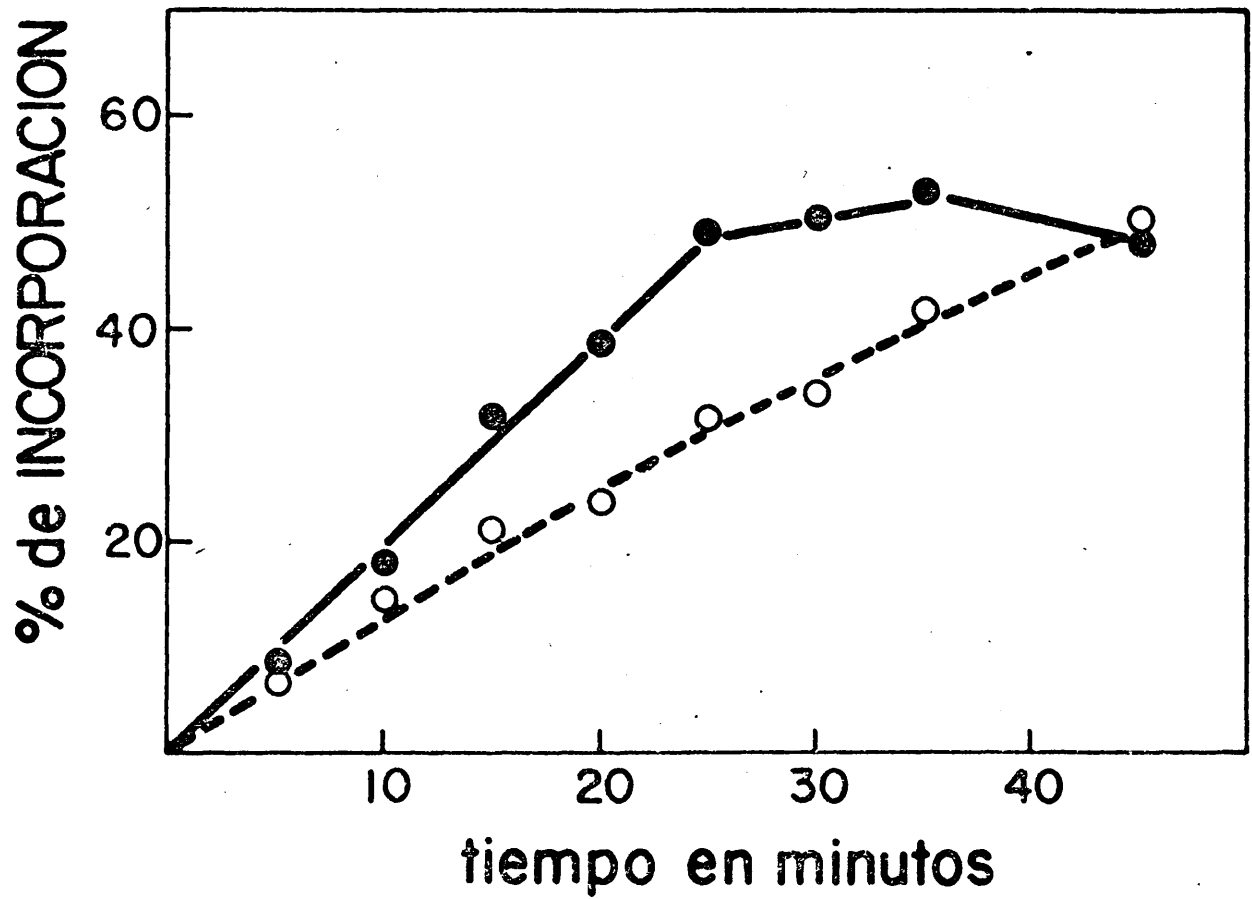


Figura 8.- Incorporación de leucina radioactiva en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -



cido radioactivo en un marcaje continuo durante el periodo de desarrollo del fago (figura 8).

Para seguir la síntesis de los polipéptidos inducidos por  $\phi 29$  en B. subtilis 110NA, se mezclaron alícuotas de cultivos infectados con  $\phi 29$  (marcados con leucina- $H^3$ ), y de cultivos de bacterias sin infectar (marcados con leucina- $C^{14}$ ), se lisaron y se disociaron las proteínas para someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida en un sistema de pH continuo (Métodos m, 1). La figura 9 muestra los resultados de la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en células infectadas con  $\phi 29$  y sin infectar marcadas en un pulso de 0 a 3 minutos después de la infección. Como puede verse, la radioactividad correspondiente a la bacteria sin infectar es mayor que la correspondiente a la bacteria infectada, excepto en la posición de la proteína denominada III en la que hay un ligero incremento de radioactividad debida a  $H^3$  sobre  $C^{14}$ . Las proteínas no estructurales inducidas por  $\phi 29$ , se nombraron provisionalmente según su movilidad electroforética en estos geles, siendo las proteínas I y XII las de menor y mayor movilidad, respectivamente.

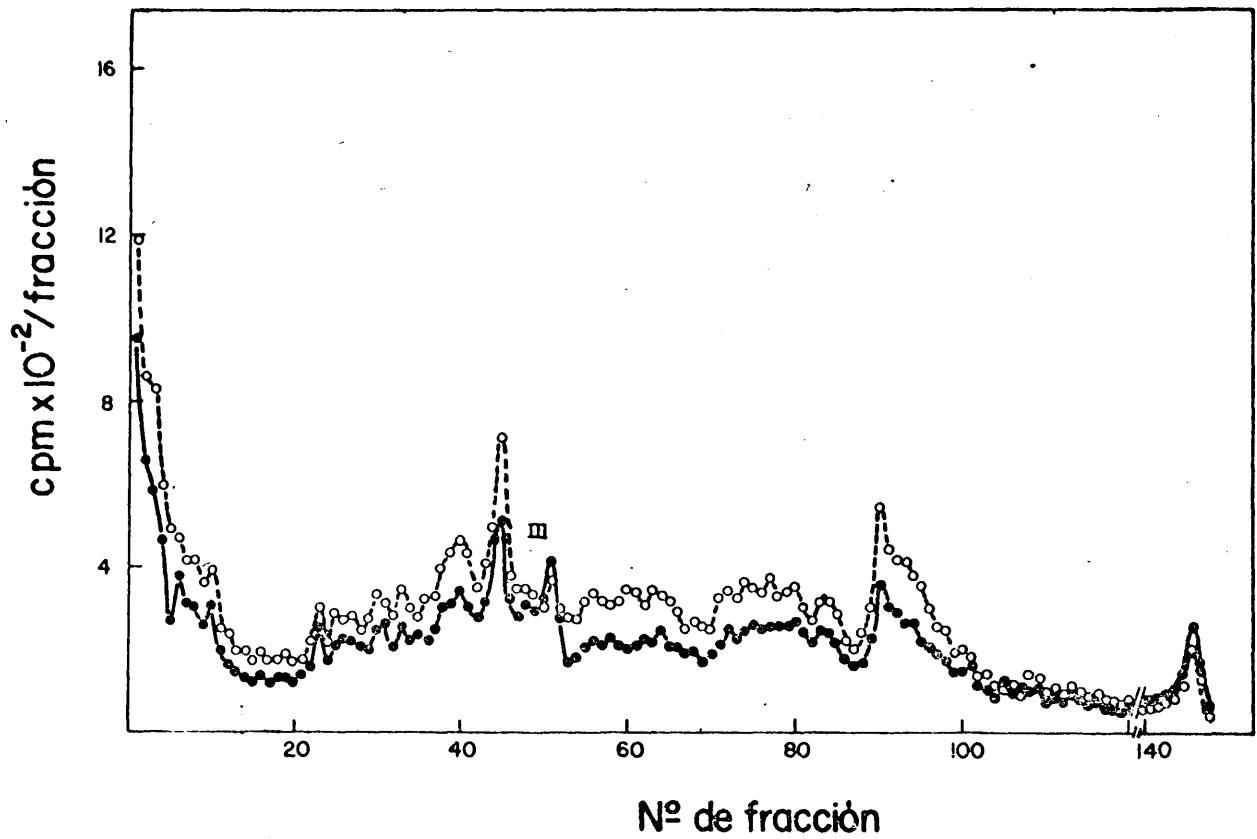


Figura 9. - Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 0 a 3 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar.-

La figura 10 muestra la coelectroforesis correspondiente al pulso de 5 a 8 minutos: la síntesis de la proteína III se incrementa considerablemente respecto al tiempo anterior, y aparecen otras proteínas, una de peso molecular mayor (proteína I) y otras de menor peso molecular (proteínas V-IX, XI y XII). La zona de las proteínas VII-IX es heterogénea y sólo se resuelve en pulsos más tardíos.

La figura 11 corresponde a la electroforesis de las proteínas sintetizadas en un pulso de 10 a 13 minutos: la síntesis de todas las proteínas presentes en el pulso anterior se incrementa. Además aparecen dos pequeños picos de radioactividad con movilidad correspondiente a las proteínas estructurales HP1 (mayoritaria de la cápsida) y HP3 (proteína que forma las fibras).

La figura 12 muestra la coelectroforesis correspondiente al pulso de 15 a 18 minutos: la síntesis de las proteínas III, XI y XII decrece y la de las proteínas V-IX permanece en su valor máximo. La mayoría de las proteínas estructurales se detectan ya en este pulso, y también dos proteínas no estructurales (II y X). En las condiciones de separación de estos geles, no es posible identificar

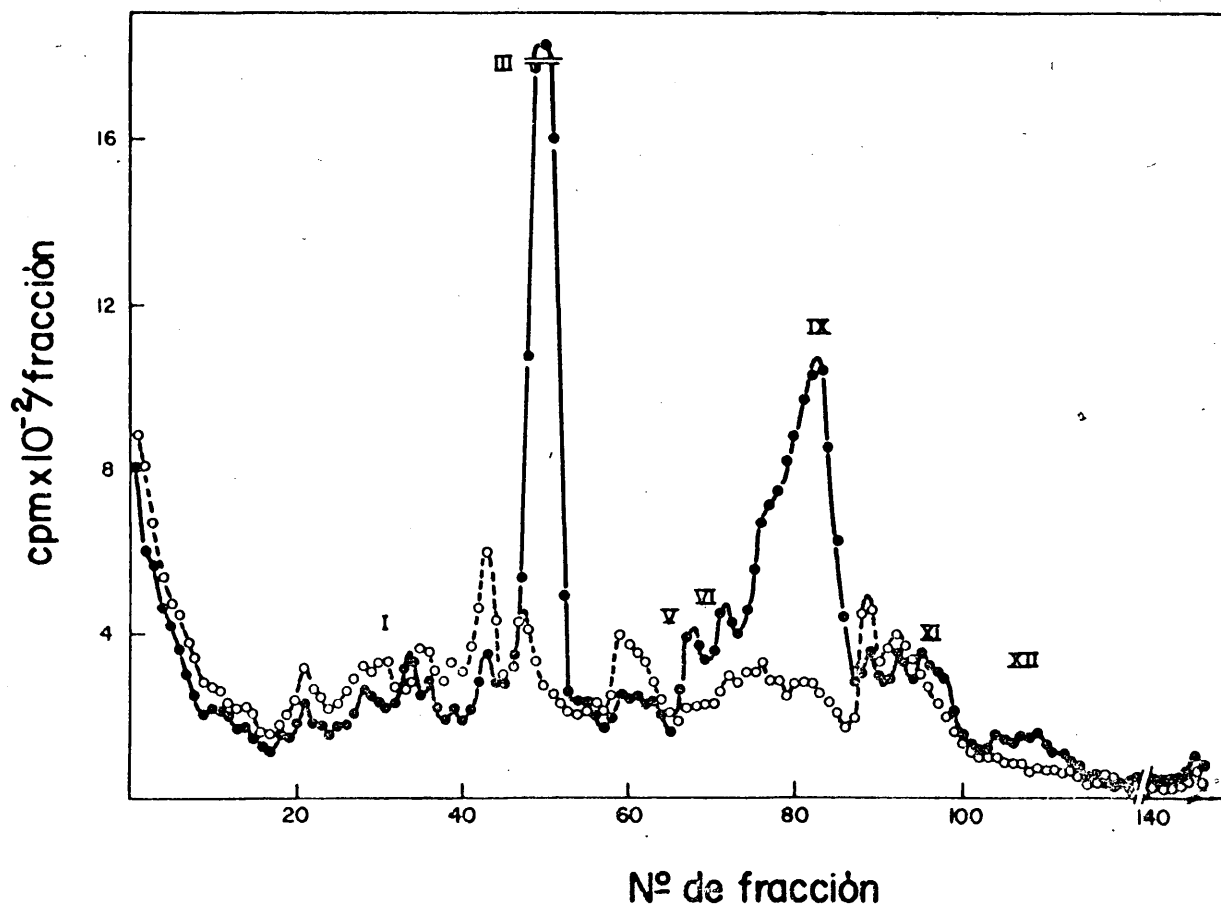


Figura 10. -Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 5 a 8 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -

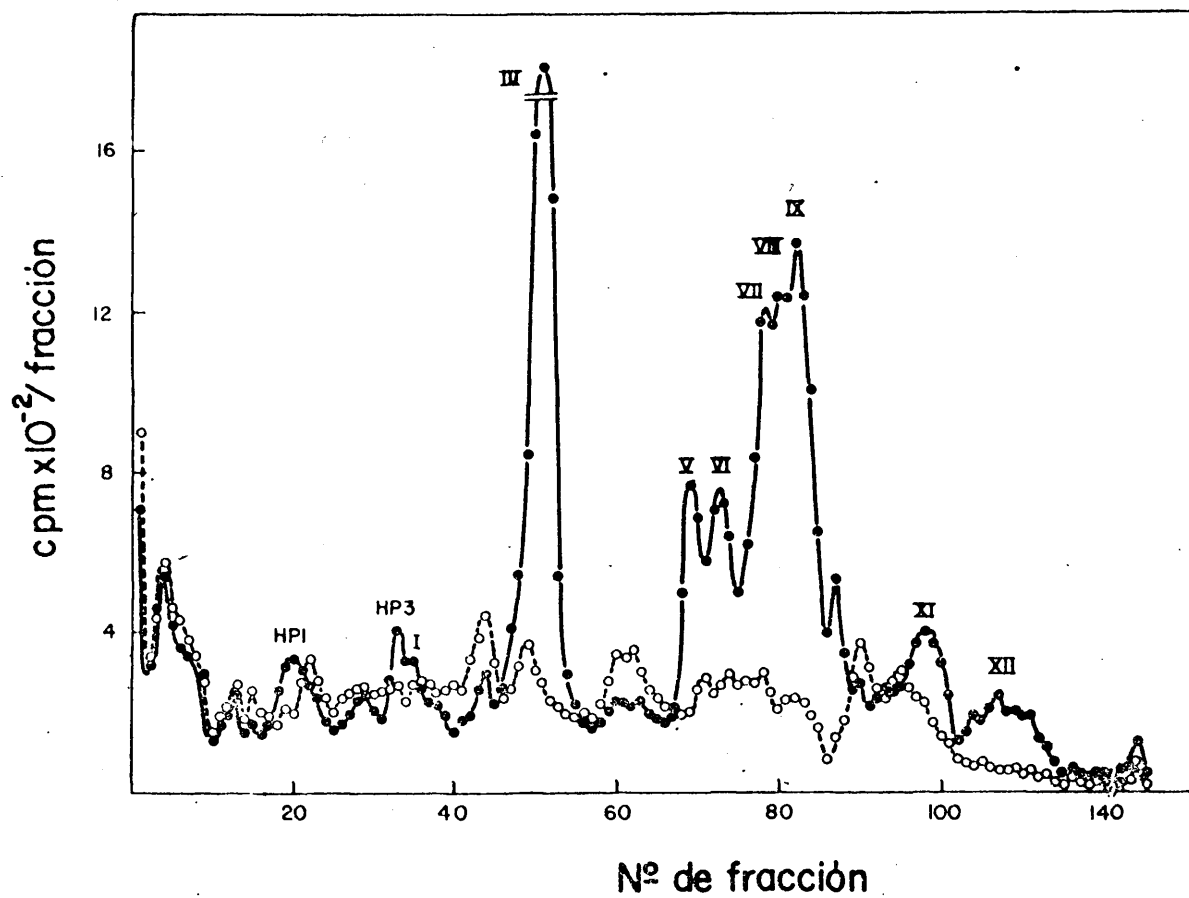


Figura 11.-Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 10 a 13 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -

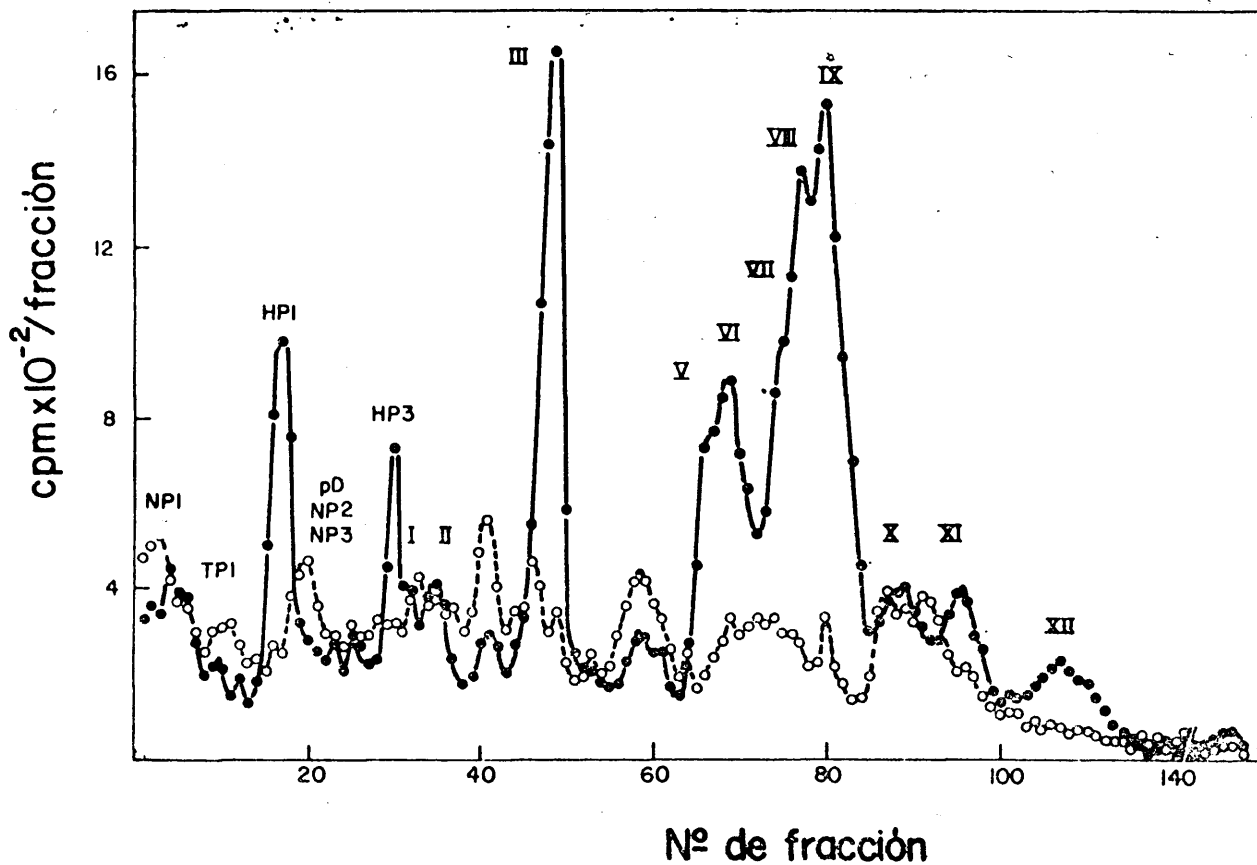


Figura 12. - Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 15 a 18 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -

a la proteína pD, que solapa con la proteína NP3. La identificación de esta proteína como producto del cistrión D se verá más adelante.

En la figura 13 correspondiente al pulso de 20 a 23 minutos, se observa que la síntesis de las proteínas III, XI y XII decrece más, mientras que la síntesis de las proteínas V-IX se mantiene a la misma velocidad.

Las proteínas estructurales NP1, TP1, HP1, NP2, NP3 y HP3, son ya muy definidas y su síntesis, así como la de las proteínas pD, II y X aumenta respecto al pulso previo. Además, aparece en este pulso un nuevo polipéptido inducido en las bacterias infectadas denominado IV.

La figura 14 corresponde a la electroforesis de las proteínas sintetizadas en un pulso de 25 a 28 minutos. La síntesis de las proteínas III, XI y XII continúa decreciendo, mientras que el resto presenta un valor máximo.

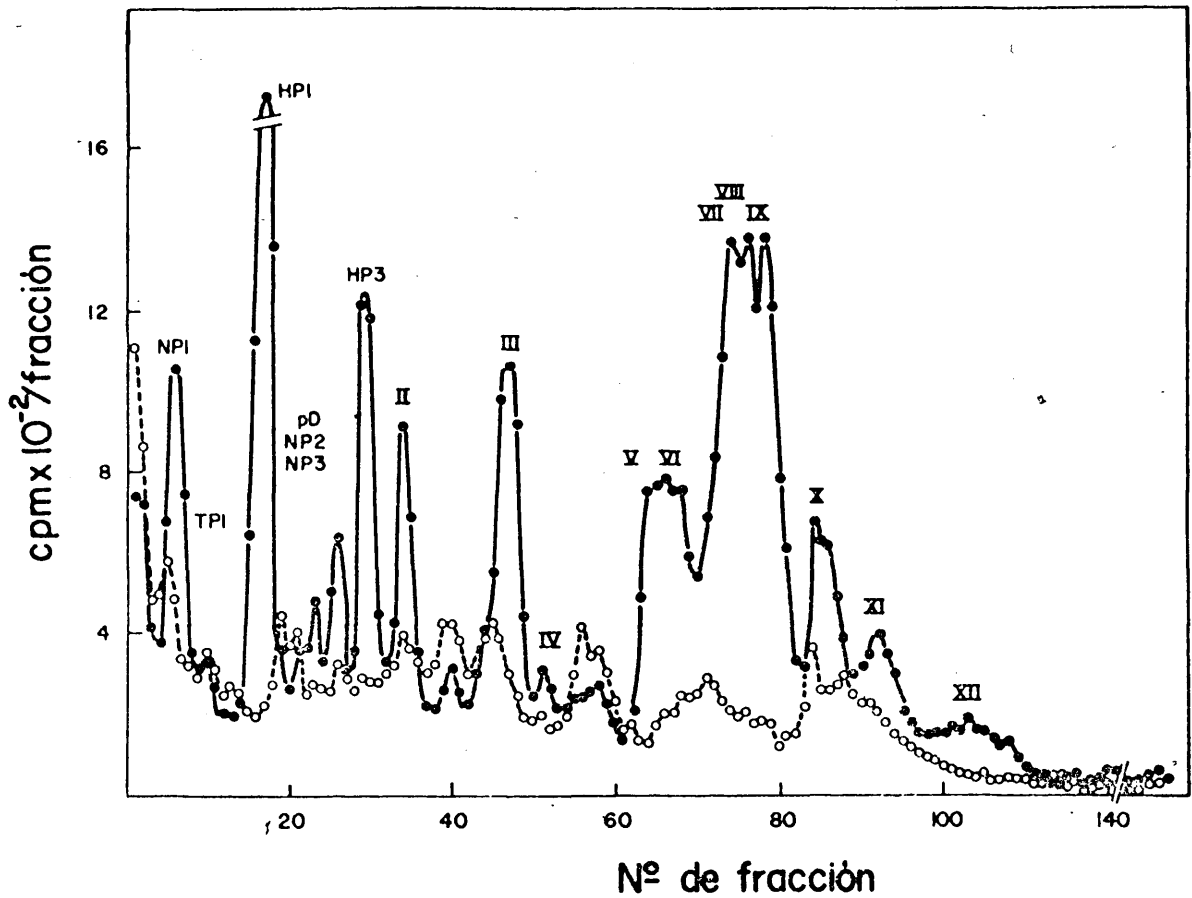


Figura 13. - Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 20 a 23 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -



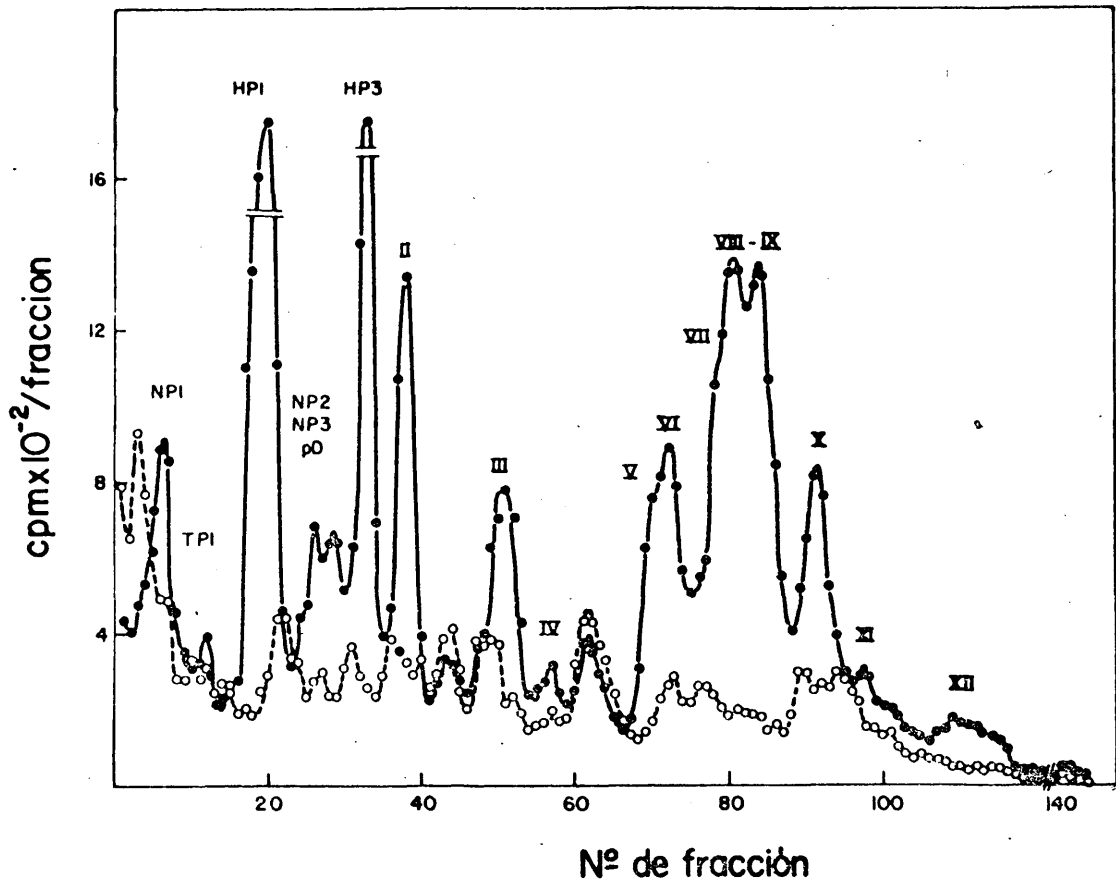


Figura 14. -Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 25 a 28 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -

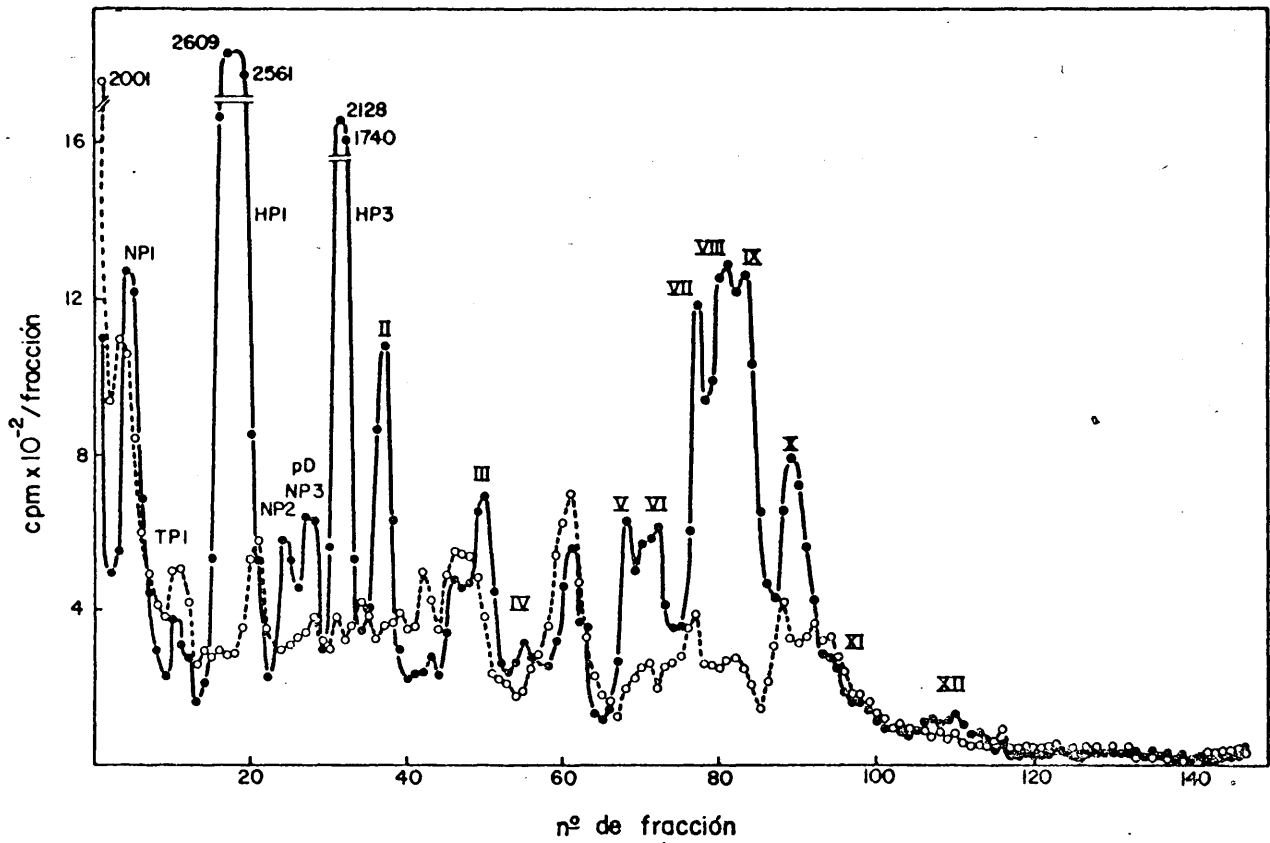


Figura 15.- Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 34 a 37 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -

En la figura 15 se muestra la electroforeis de las proteínas sintetizadas en un pulso de 34 a 37 minutos. La síntesis de la mayoría de las proteínas decrece, debido probablemente a la lisis de las bacterias infectadas.

c) Coelectroforesis de las proteínas estructurales presentes en la partícula viral y las proteínas estructurales inducidas en bacterias irradiadas marcadas radioactivamente mediante pulso y caza.

La posición de las proteínas estructurales sintetizadas en las bacterias irradiadas e infectadas con el fago  $\phi 29$  se determinó por coelectroforesis de una mezcla de proteínas marcadas con leucina- $H^3$  de cada pulso y fago  $\phi 29$  marcado con leucina- $C^{14}$  y purificado como se describe en Métodos f.

Como la proteína HP2 no se resuelve bien en el sistema de electroforesis empleado, se utilizó el sistema pH discontinuo en geles cilíndricos de 10 cm., como se describe en Métodos m, 2. La figura 16 muestra la coelectroforesis en este sistema de las proteínas inducidas

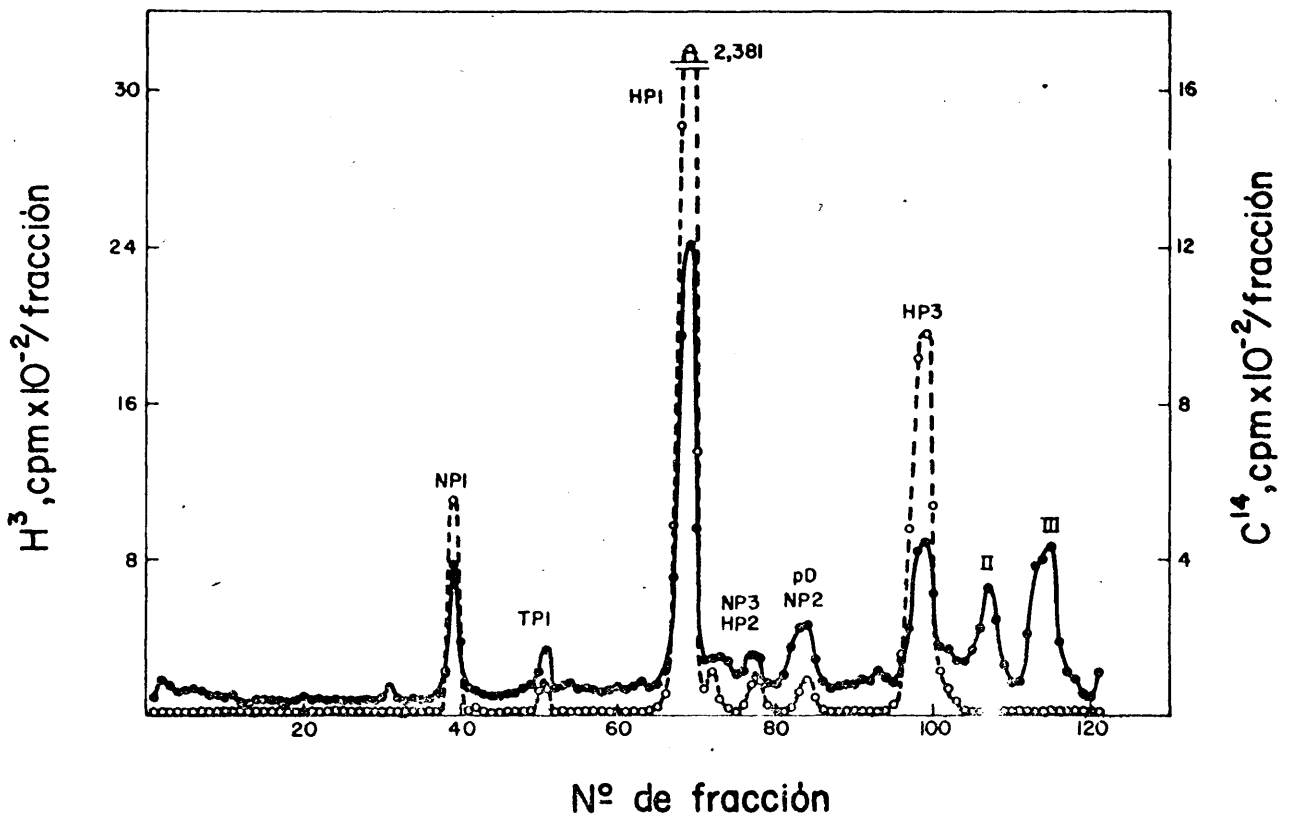


Figura 16. - Coelectroforesis de las proteínas estructurales del fago  $\phi 29$  y las proteínas inducidas en *B. subtilis* infectado con  $\phi 29$ .

en la bacteria irradiada e infectada con  $\phi 29$ , marcadas con leucina- $H^3$  en un pulso de 20 a 23 minutos, seguidos de caza de 2 minutos, y fago  $\phi 29$  purificado marcado con leucina- $C^{14}$ . Todas las proteínas estructurales del fago se resuelven y corresponden con proteínas marcadas en el pulso obtenido de las bacterias infectadas. Se ha demostrado (98) que en el sistema de electroforesis de pH discontinuo empleado en estos experimentos, la movilidad de las proteínas estructurales NP2 y NP3 presenta anomalías respecto a su movilidad en los geles de pH continuo. En la figura 16, la proteína pD se superpone con el pico correspondiente a la proteína NP2 en vez de coincidir con la proteína NP3 como sucedía en los geles de pH continuo.

Como control, se realizó una coelectroforesis de las proteínas marcadas en un pulso idéntico (20 a 23 minutos), en bacterias sin infectar e infectadas con  $\phi 29$  (figura 17). Los picos de radioactividad correspondiente a las proteínas NP2 y NP3 solapan parcialmente con un pico de proteína sin infectar, mientras que el resto de las proteínas estructurales no tiene contaminación de proteínas de la bacteria.

Si se calcula la radioactividad específica del fago me-

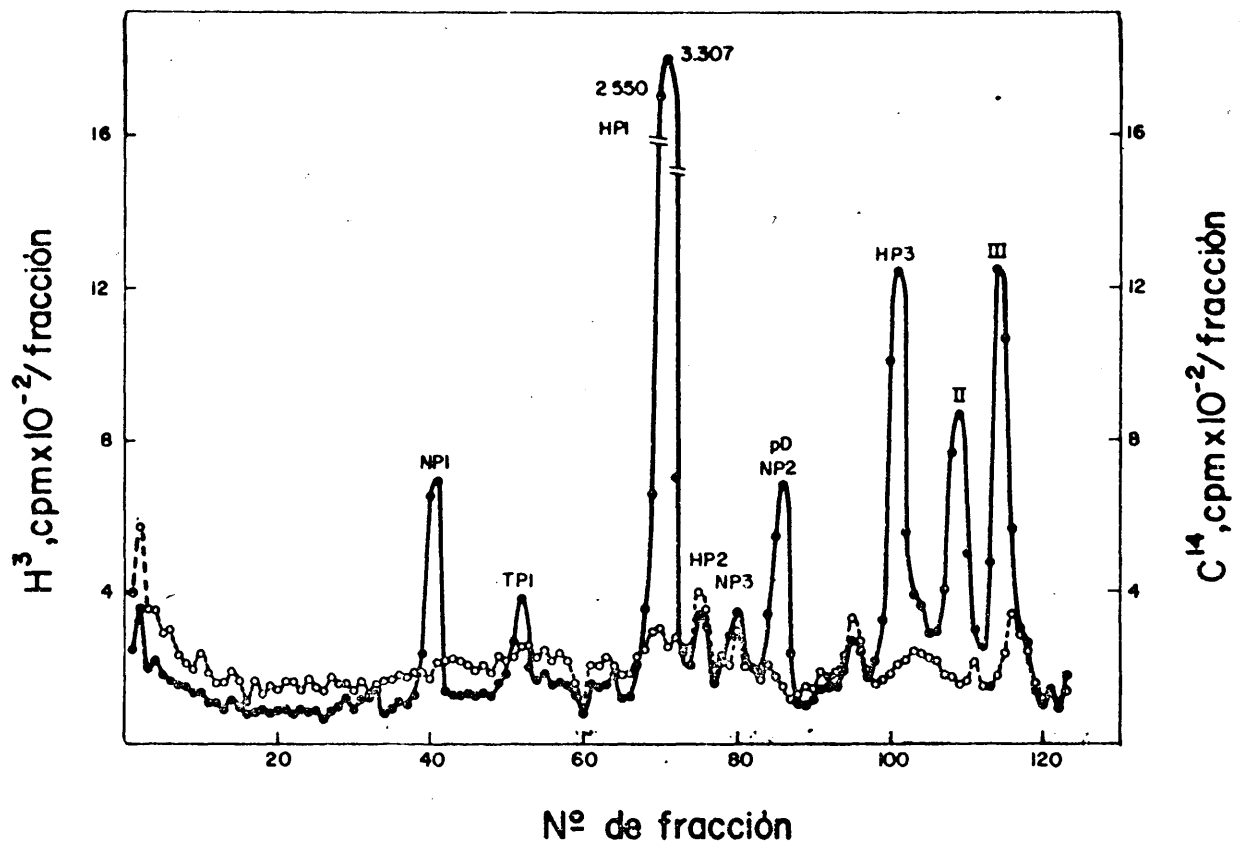


Figura 17.- Coelectroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* irradiado, infectado con el fago  $\phi 29$  y sin infectar.-

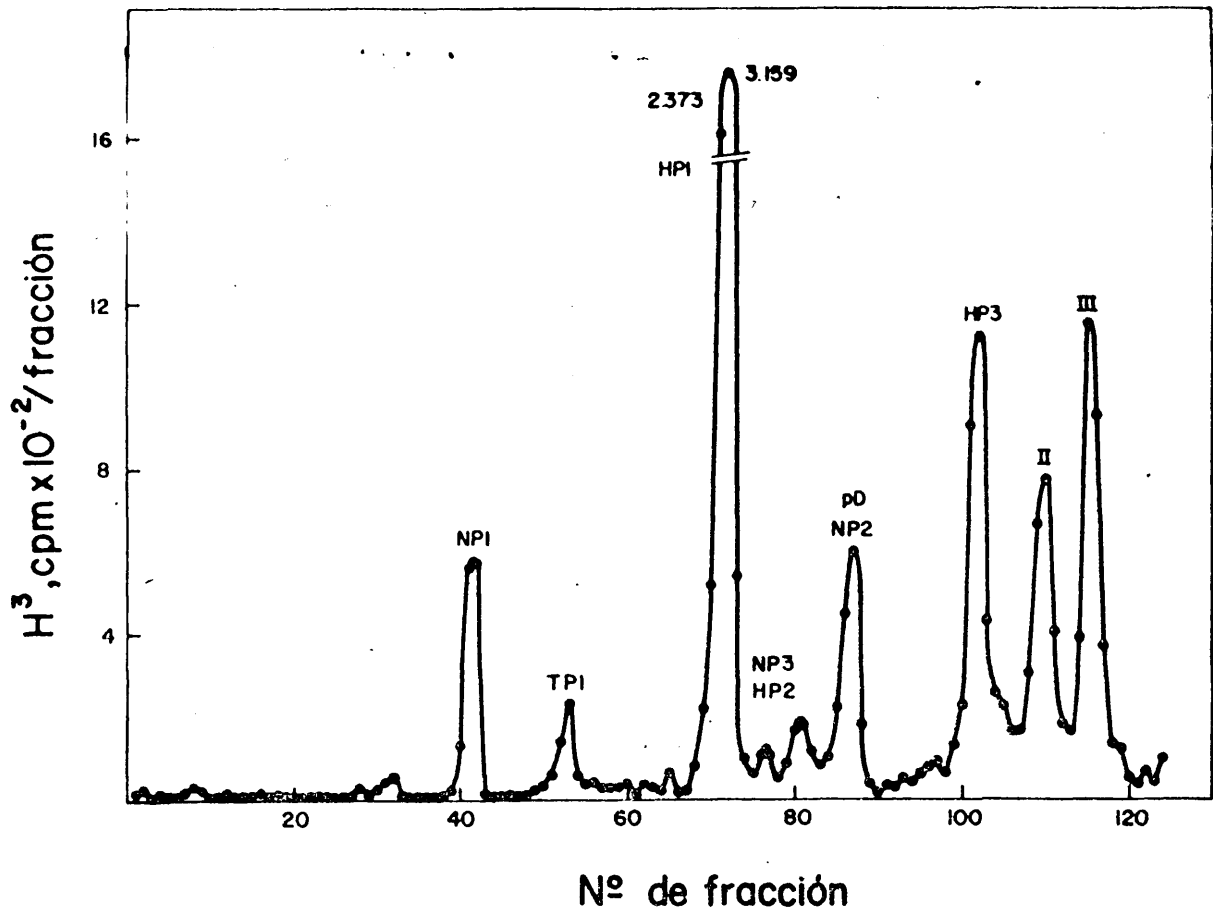


Figura 18.- Perfil electroforético de la radioactividad específica de fago. -

dianete el método de Mayol y Sinsheimer (99), considerando que la radioactividad de  $H^3$ , debida a proteínas inducidas por el fago después de la infección es igual a la radioactividad de  $H^3$  obtenida en el contador, menos la relación mínima de  $H^3/C^{14}$  determinada en las fracciones del gel, multiplicada por la radioactividad de  $C^{14}$  obtenida en el contador para cada fracción. De esta forma, aparece un pico de radioactividad específica de bacteria infectada en la zona de las proteínas HP2 y NP3 (figura 18), e igualmente aparecen claramente definidas el resto de las proteínas estructurales.

d) Cinética de síntesis de las proteínas inducidas por el fago  $\phi 29$ .

La cinética de síntesis de las proteínas inducidas por  $\phi 29$  se ha determinado calculando el porcentaje del máximo valor de la proteína sintetizada para cada una de ellas, en cada pulso.

Para calcularlo, se determinó la radioactividad correspondiente a las proteínas específicas del fago en cada uno de los picos de proteína radioactiva, mar-



cada en los pulsos de 0 a 3 minutos, 5 a 8, 10 a 13, 15 a 18, 20 a 23, 25 a 28, 34 a 37, seguida en todos los casos de una caza de dos minutos. El cálculo de la radioactividad específica de fago se realizó según el método de Mayol y Sinsheimer (99), descrito en el apartado anterior.

La figura 19 muestra los resultados obtenidos para las proteínas inducidas no estructurales. Se pueden observar 3 esquemas distintos de síntesis: a) Existen 3 proteínas (III, XI y XII), que aparecen inmediatamente después de la infección (0-8 minutos), alcanzan su velocidad máxima de síntesis a los 10-13 minutos, y después decrecen. b) Otro grupo es el formado por las proteínas V a IX, que aparecen inmediatamente después de la infección, pero que una vez alcanzada su velocidad máxima de síntesis (15 minutos), permanecen al mismo nivel durante todo el ciclo de desarrollo del fago. La cinética de la proteína I no se ha representado, ya que es difícil diferenciar de la proteína HP3 después

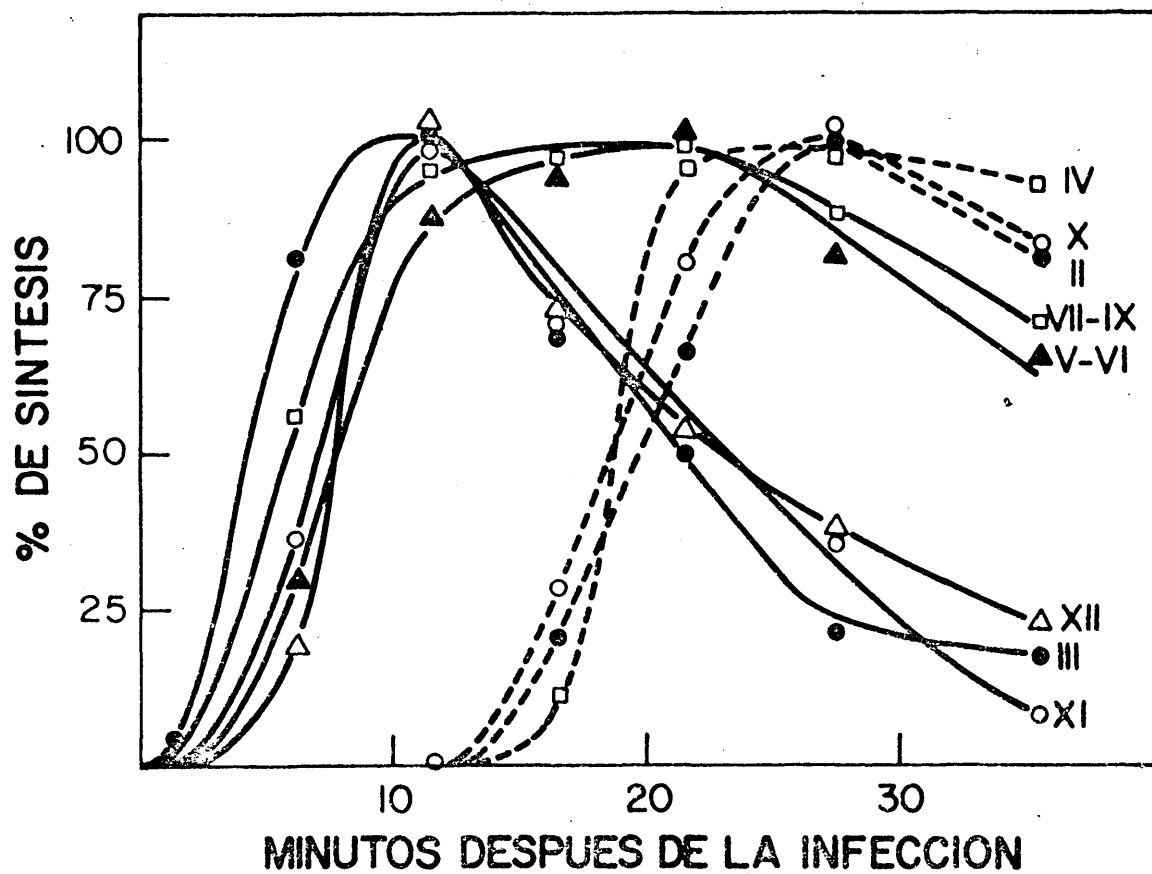


Figura 19.- Cinética de síntesis de las proteínas no estructurales inducidas en B. subtilis infectado con el fago  $\phi 29$ .

del pulso de 10 a 13 minutos debido a la gran cantidad de esta última que se sintetiza. En cualquier caso, la proteína I puede ser clasificada como temprana ya que aparece poco después de la infección.

c) Un tercer grupo de proteínas no estructurales incluye las proteínas II, IV y X, cuya síntesis empieza al mismo tiempo que las proteínas estructurales, y presenta una cinética similar a éstas. En las condiciones de separación empleadas, la cinética de la proteína pD es indistinguible de la cinética de síntesis de la proteína NP2. La figura 20 presenta las cinéticas de síntesis de las proteínas estructurales del fago Ø29, inducidas en bacterias irradiadas. Como se ve, la cinética de todas ellas es similar, empezando la síntesis entre los 10 y los 13 minutos, aumentando a lo largo del desarrollo del fago hasta que alcanzan un máximo entre los 25 y 30 minutos, y después decrecen, debido probablemente a lisis de la bacteria huésped.

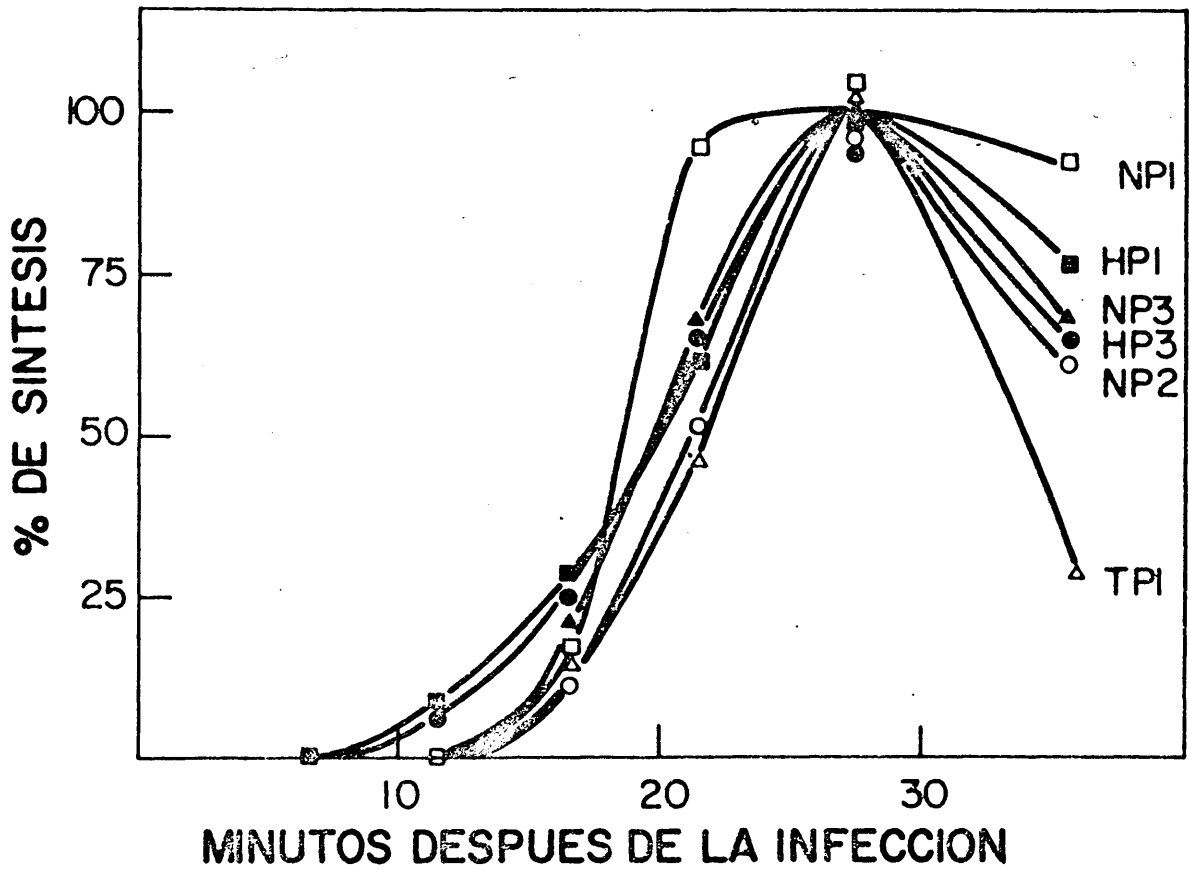


Figura 20. - Cinética de síntesis de las proteínas estructurales inducidas en B. subtilis infectado con el fago  $\phi 29$ . -

e) Existencia de un precursor de la proteína que forma los apéndices del cuello del fago Ø29.

Cuando se marca con leucina- $H^3$ , Bsubtilis irradiado e infectado con Ø29, durante un pulso de 22 a 24 minutos después de la infección, y se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida como se ha descrito (ver Métodos g, 3), aparecen todas las proteínas inducidas por el fago en un control marcado durante un pulso de 21 a 26 minutos seguido de una caza de 5 minutos (figura 21). Además, aparece una proteína (RNP1) que en el control marcado en pulso y caza, se obtiene en bajas cantidades. Para resolver mejor esta zona, se empleó un sistema de electroforesis de pH discontinuo como se describe en Métodos m, 2. En estas condiciones (figura 22) se aprecia claramente la existencia de la proteína P-NP1, en una zona que corresponde a un peso molecular de 90.000 (figura 23).

La figura 24, muestra la electroforesis de las proteínas marcadas durante dos minutos y cazadas en presencia de un exceso de leucina no radioactiva durante cinco minutos.

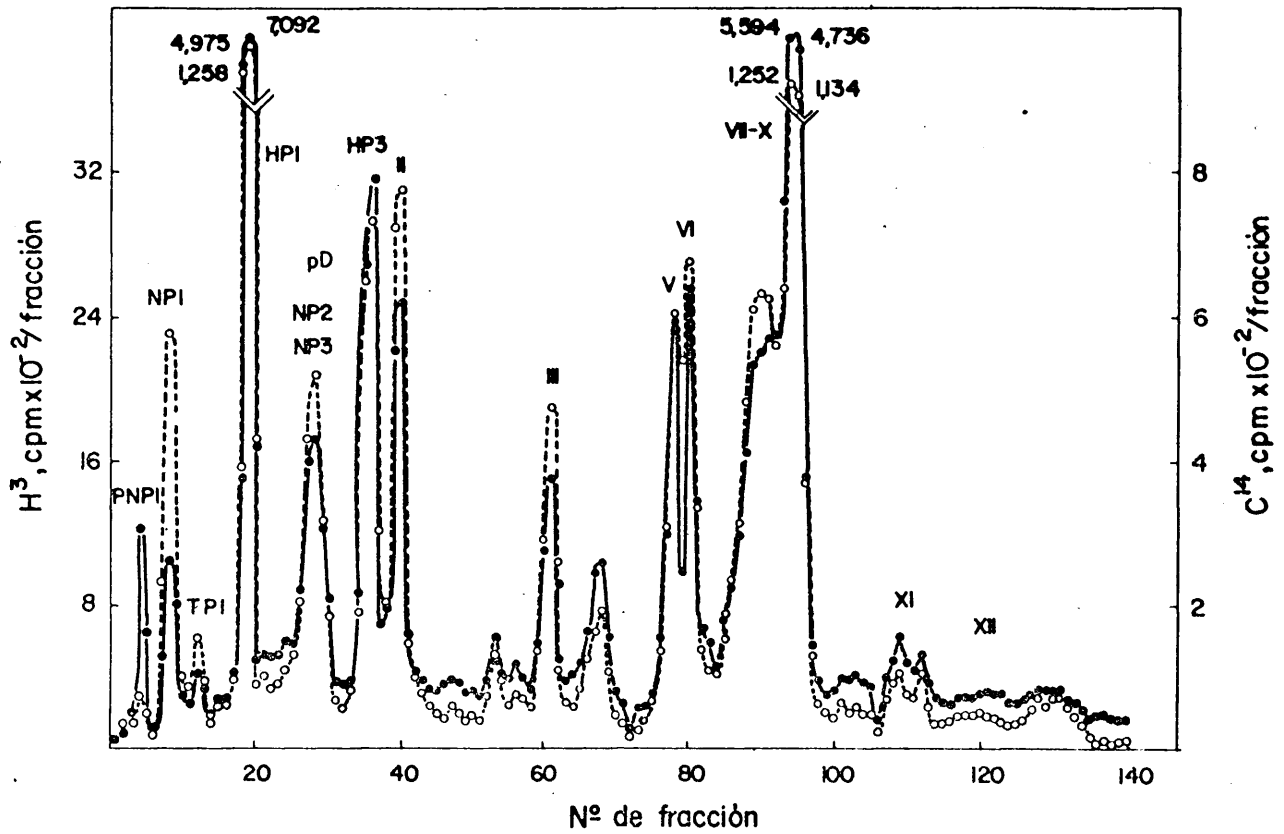


Figura 21. - Coelectroforesis en sistema de pH continuo de las proteínas marcadas radioactivamente en un pulso de 22 a 24 min. después de la infección de *B. subtilis* con  $\phi 29$  frente a las proteínas marcadas radioactivamente en un pulso de 21 a 26 min. seguido de caza. -

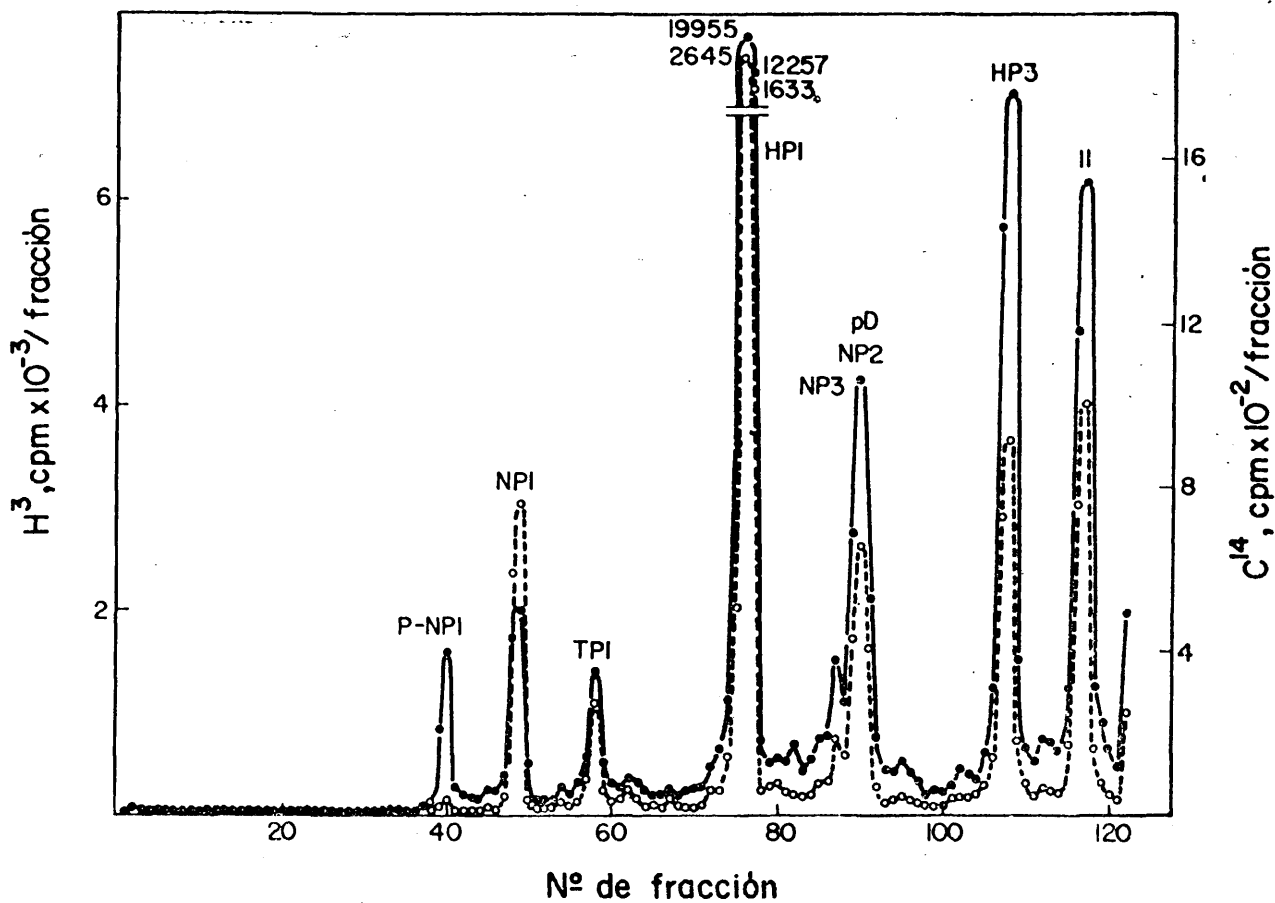


Figura 22.- Coelectroforesis en sistema de pH discontinuo de las proteínas marcadas radioactivamente en un pulso de 22 a 24 min. después de la infección de *B. subtilis* con  $\phi 29$  frente a las proteínas marcadas radioactivamente en un pulso de 21 a 26 min. seguido de caza. -

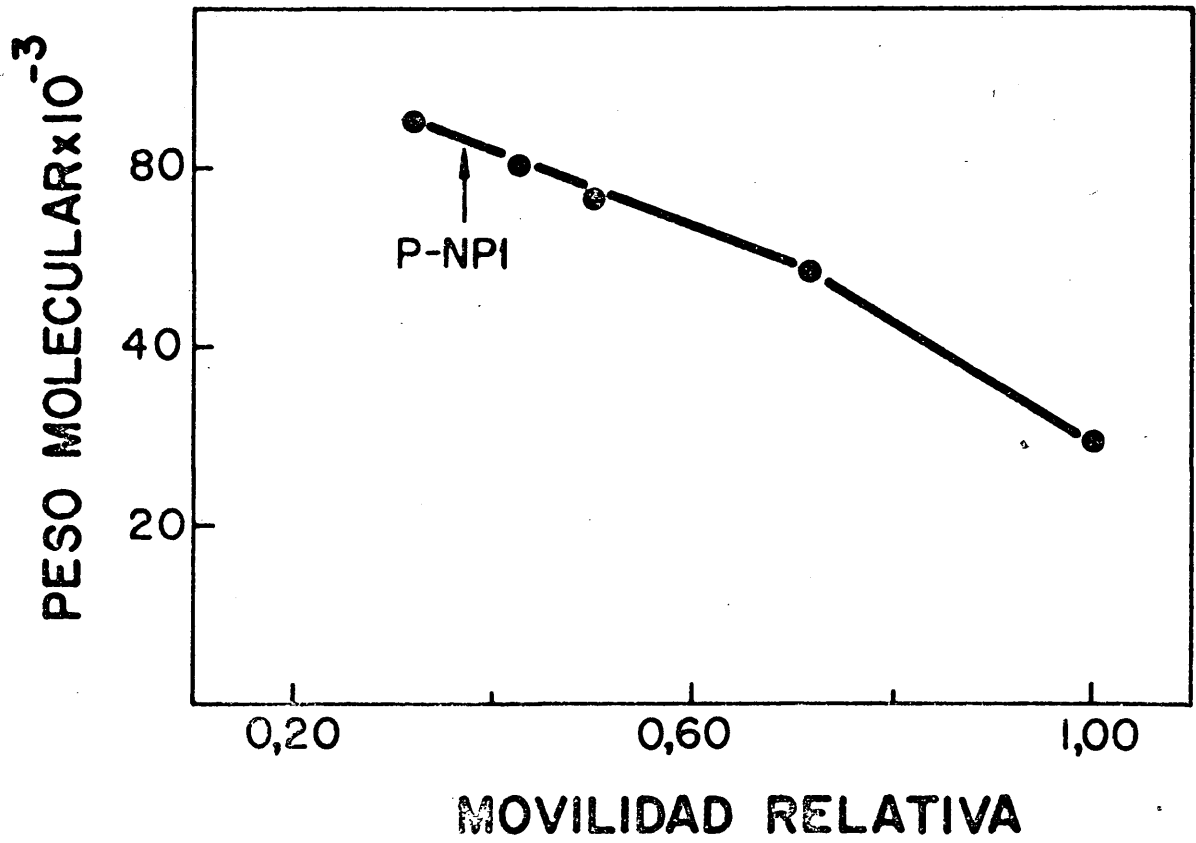


Figura 23. - Estimación del peso molecular de la proteína P-NP1. -



La mayor parte de la radioactividad presente en el pico de proteína P-NP1 desaparece y se obtiene un incremento paralelo en la zona correspondiente a la proteína NP1.

En el sistema de pH discontinuo se observa más claramente esta transformación (figura 25).

Los controles de las proteínas sintetizadas en las mismas condiciones en bacterias irradiadas sin infectar (figuras 26 y 27) sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en los dos sistemas (pH continuo y discontinuo), demuestran que el polipéptido de peso molecular 90.000 no está presente en células sin infectar, lo que indica que es una proteína inducida después de la infección.

Otra manera de demostrar la relación estructural entre las proteínas NP1 y P-NP1 es analizar los péptidos tripticos de ambas proteínas.

Una mezcla de proteínas P-NP1 y NP1 marcadas con metionina- $S^{35}$  y  $H^3$  respectivamente, digeridas con tripsina, se

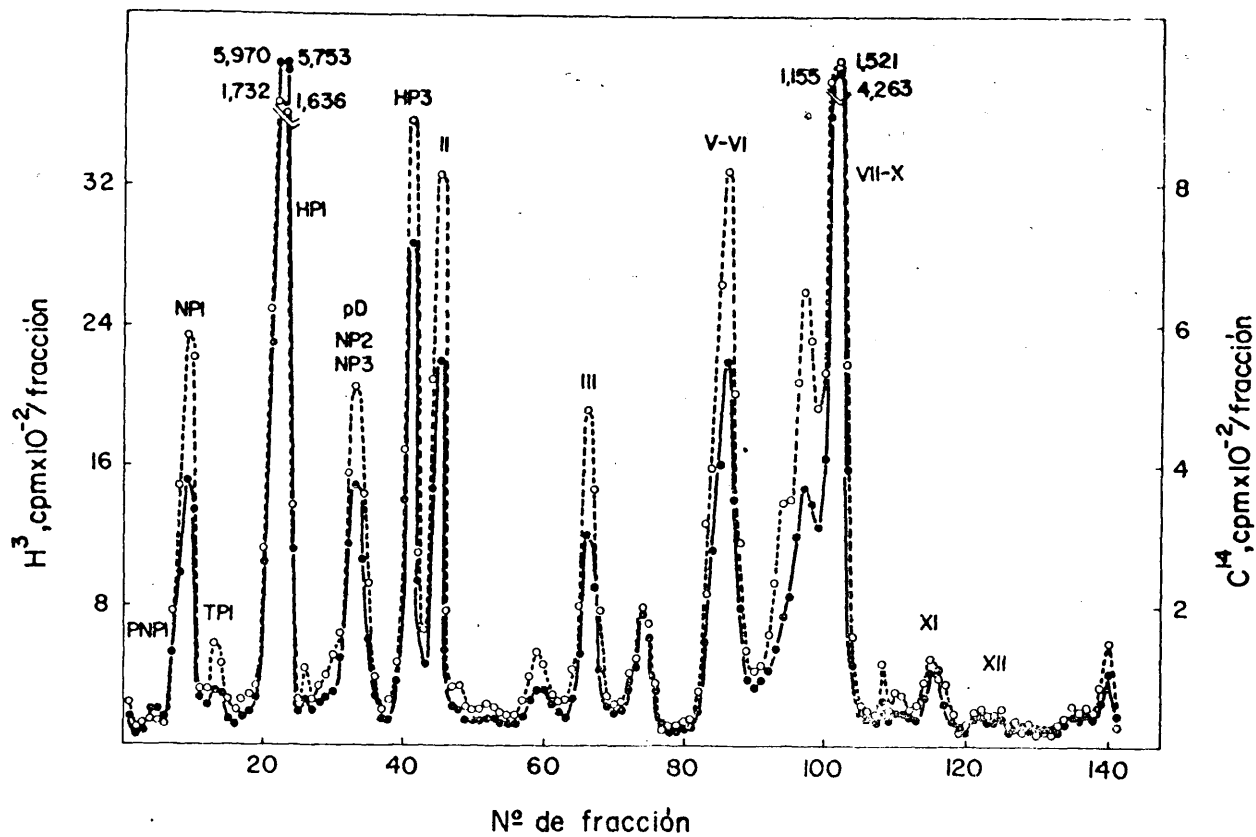


Figura 24.- Coelectroforesis en sistema de pH continuo de las proteínas marcadas radioactivamente en *B. subtilis* infectado con  $\phi 29$ , marcadas mediante pulso de 2 min. y caza frente a las proteínas marcadas en pulso de 5 min. y caza.-

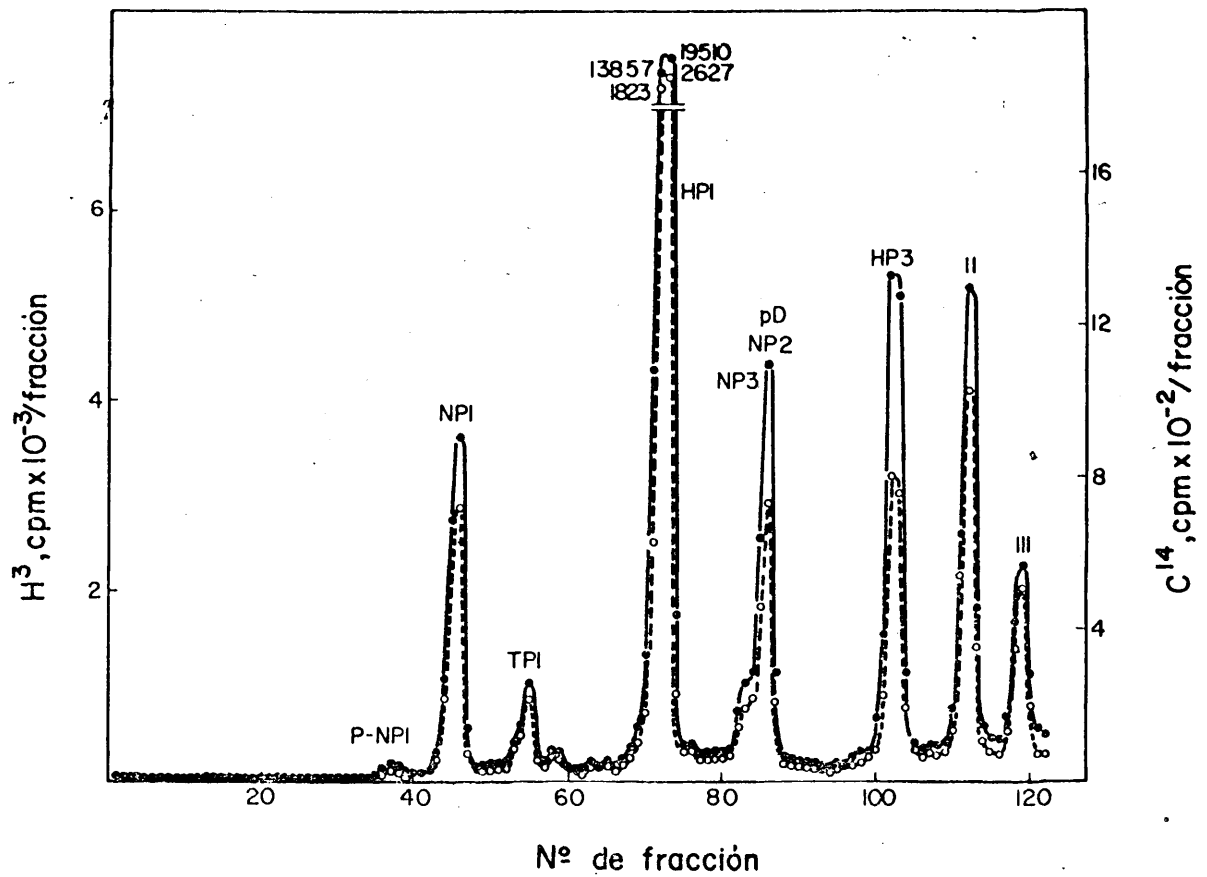


Figura 25.- Coelectroforesis en sistema de pH discontinuo de las proteínas marcadas radioactivamente en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , marcadas mediante pulso de 2 min. y caza, frente a las proteínas marcadas en pulso de 5 min. y caza. -

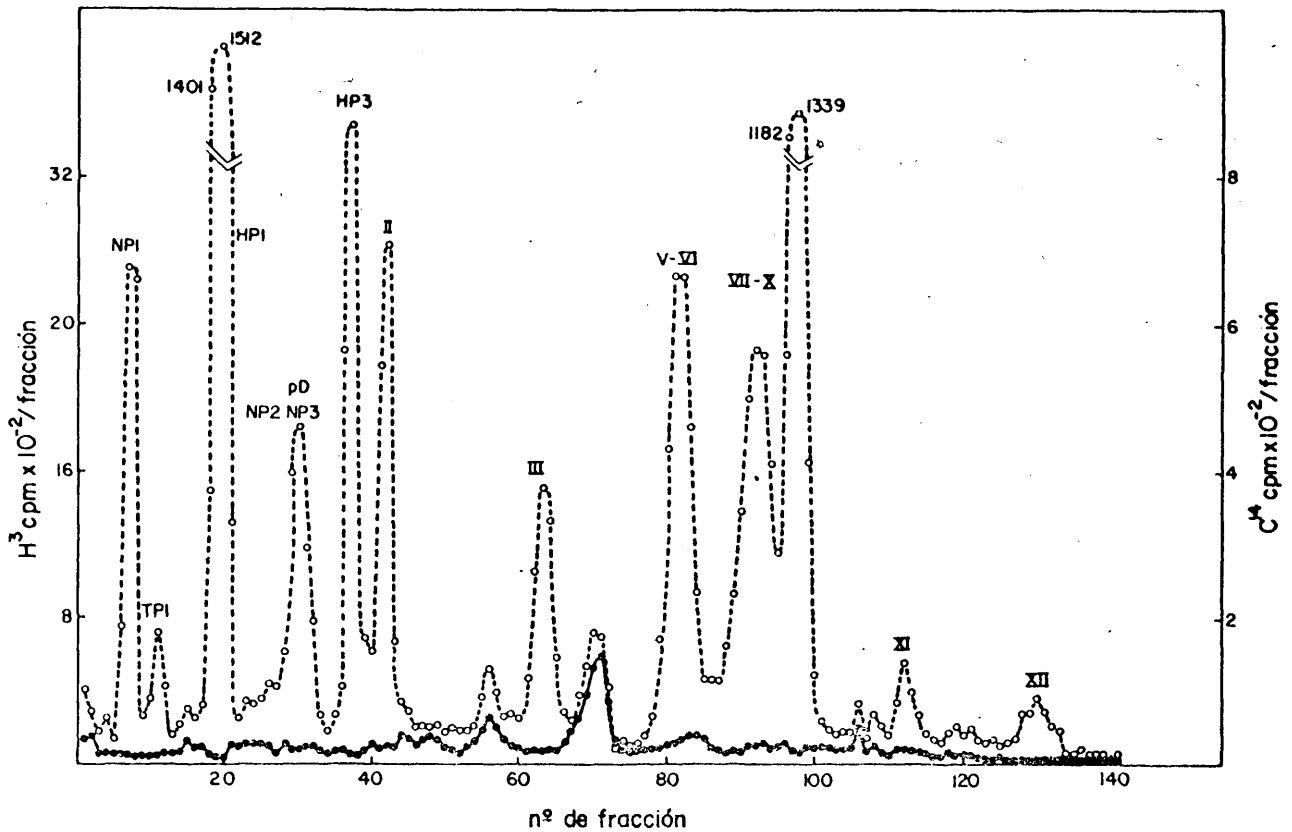


Figura 26. - Coelectroforesis en sistema de pH continuo de las proteínas marcadas en B. subtilis sin infectar marcadas en un pulso de 22 a 24 min. frente a las proteínas marcadas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , en un pulso de 21 a 26 min., seguido de caza. -

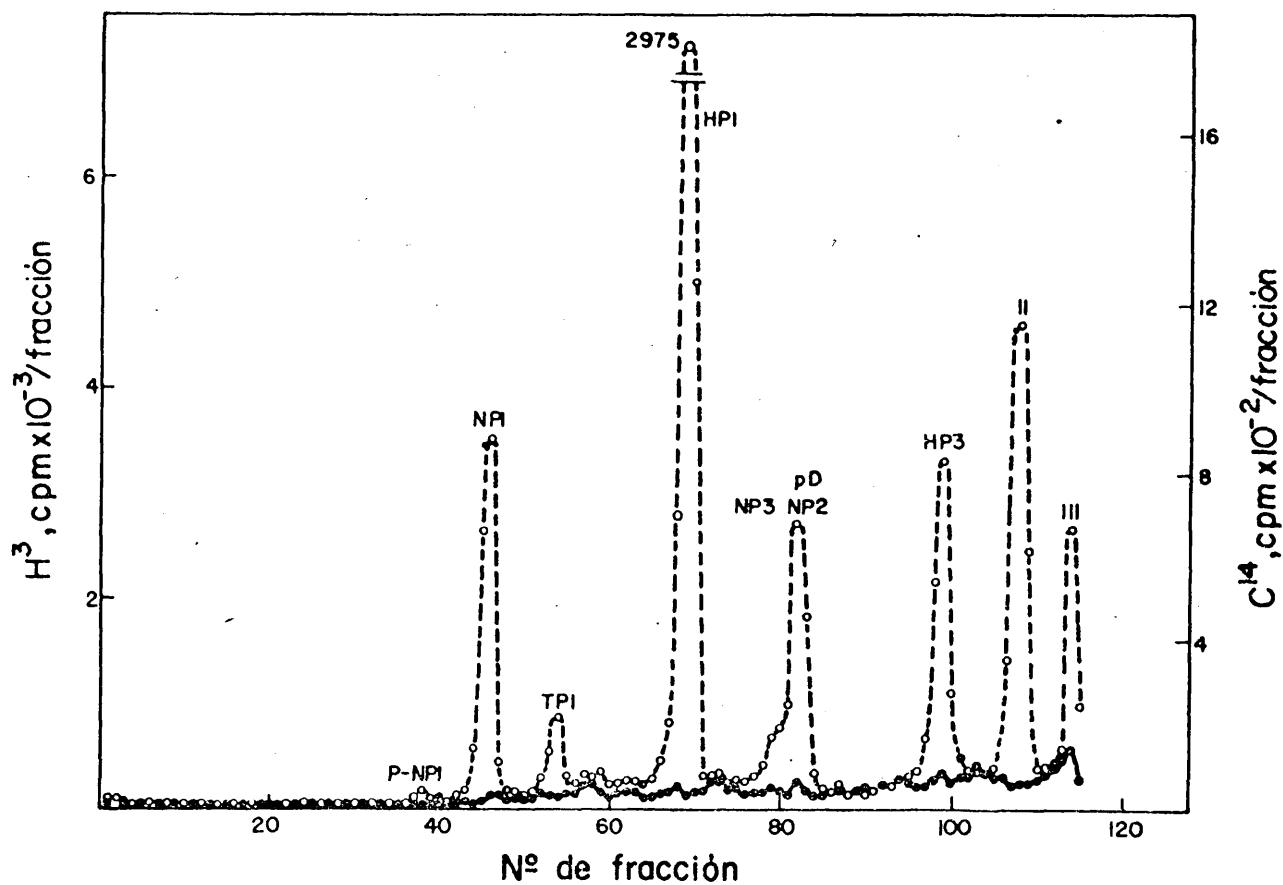


Figura 27. - Coelectroforesis en sistema de pH discontinuo de las proteínas marcadas en B. subtilis sin infectar marcadas en un pulso de 22 a 24 min. frente a las proteínas marcadas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , en un pulso de 21 a 26 min., seguido de caza. -

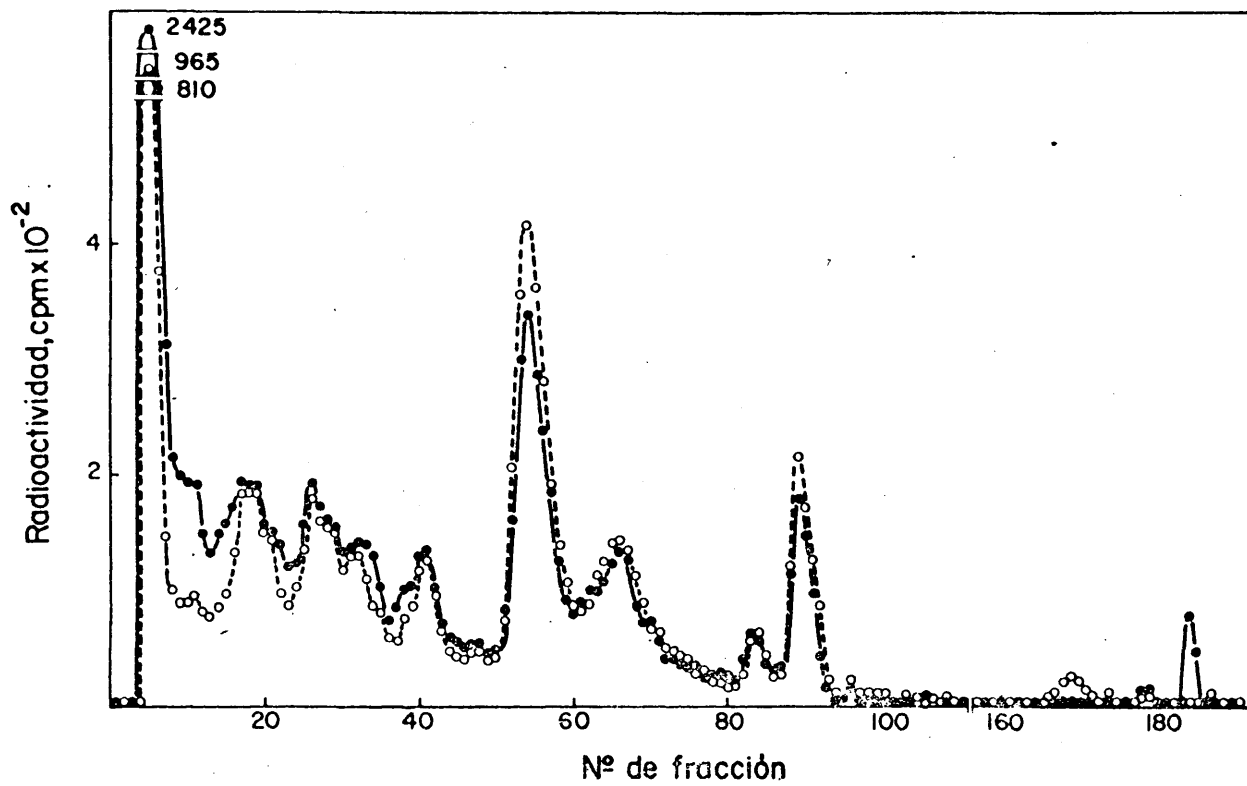


Figura 28.- Péptidos trípticos de las proteínas P-NP1 y NP1.-

sometieron a cromatografía de cambio de ión en una columna de resina cambiadora Beckman PA-35 como se describe en Métodos, h. La figura 28 muestra que los péptidos trípticos de ambas proteínas son muy similares, indicando una estrecha relación estructural entre ambas.

f) Bloqueo de la transformación del precursor en proteína NP1 en mutantes sensibles a temperatura en el cistrón B.

El análisis de las proteínas sintetizadas por el mutante sus B47 al infectar a Bsubtilis su<sup>-</sup>, muestra que en estas condiciones restrictivas no se produce ni la proteína P-NP1 ni la NP1 (100). Estos resultados indican que la proteína precursora P-NP1 está especificada por el cistrón B.

Para ver si los mutantes sensibles a temperatura en este cistrón tienen o no bloqueada la transformación del precursor en producto, se infectó B.subtilis irradiado con luz ultravioleta con 3 mutantes sensibles a

temperatura en el cistrón B realizándose la incubación a temperatura restrictiva (42°C). Las bacterias infectadas se marcaron mediante un pulso de 15 a 30 minutos y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe en Métodos m, 2.

La figura 29 muestra que entre las proteínas sintetizadas por el mutante tsB73 en condiciones restrictivas de temperatura, se acumula una mayor cantidad de precursor que en las sintetizadas por el fago  $\phi$ 29 - normal en las mismas condiciones,

Como control, la figura 30 muestra la electroforesis de las proteínas sintetizadas por fago normal y las sintetizadas por la bacteria sin infectar en las mismas condiciones. La proteína acumulada en las bacterias infectadas por el mutante ts B73 en condiciones restrictivas es específica del fago.

Un resultado similar se obtuvo con las proteínas sintetizadas en condiciones restrictivas de temperatura, con los mutantes ts B66 (figura 31) y tsB74 (figura 32)



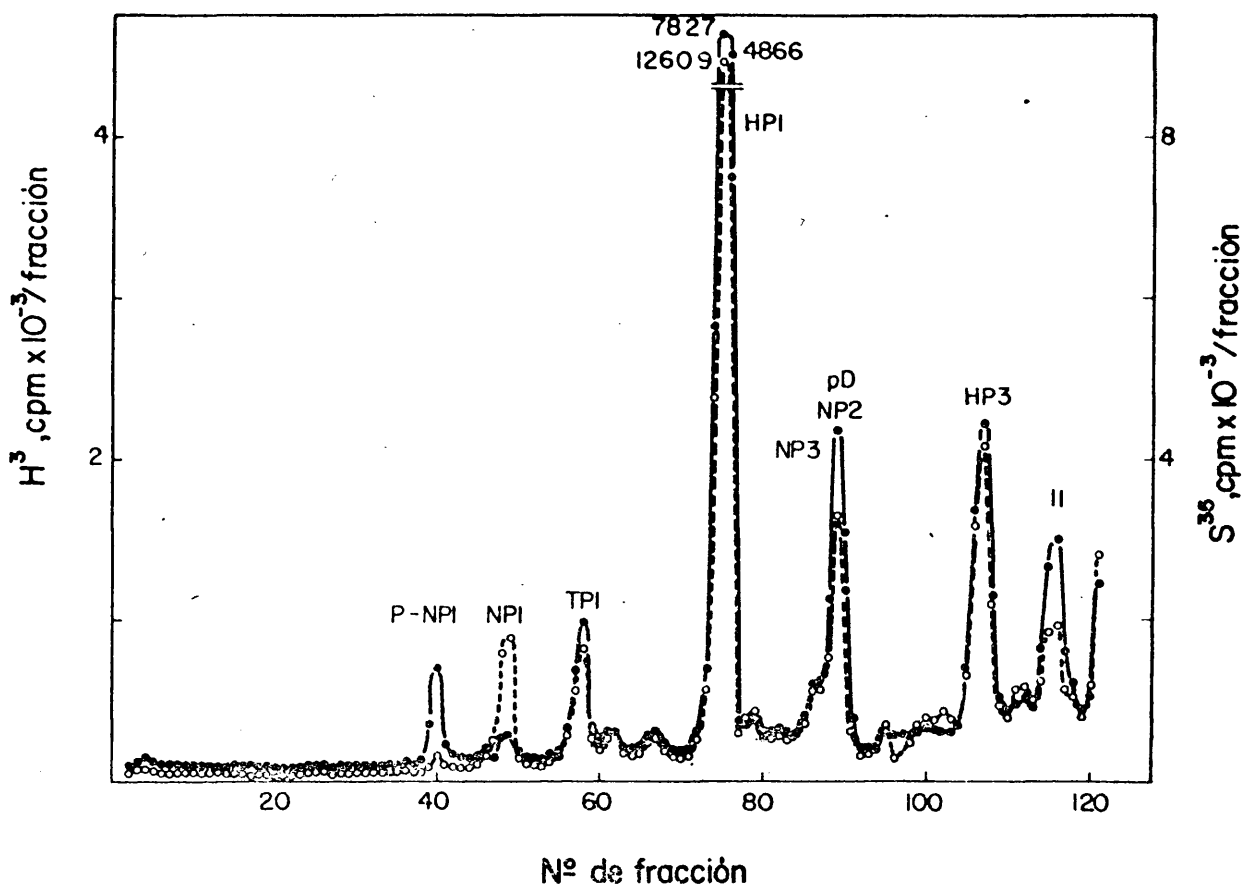


Figura 29.- Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* infectado por el mutante ts B73 a 42°C.-

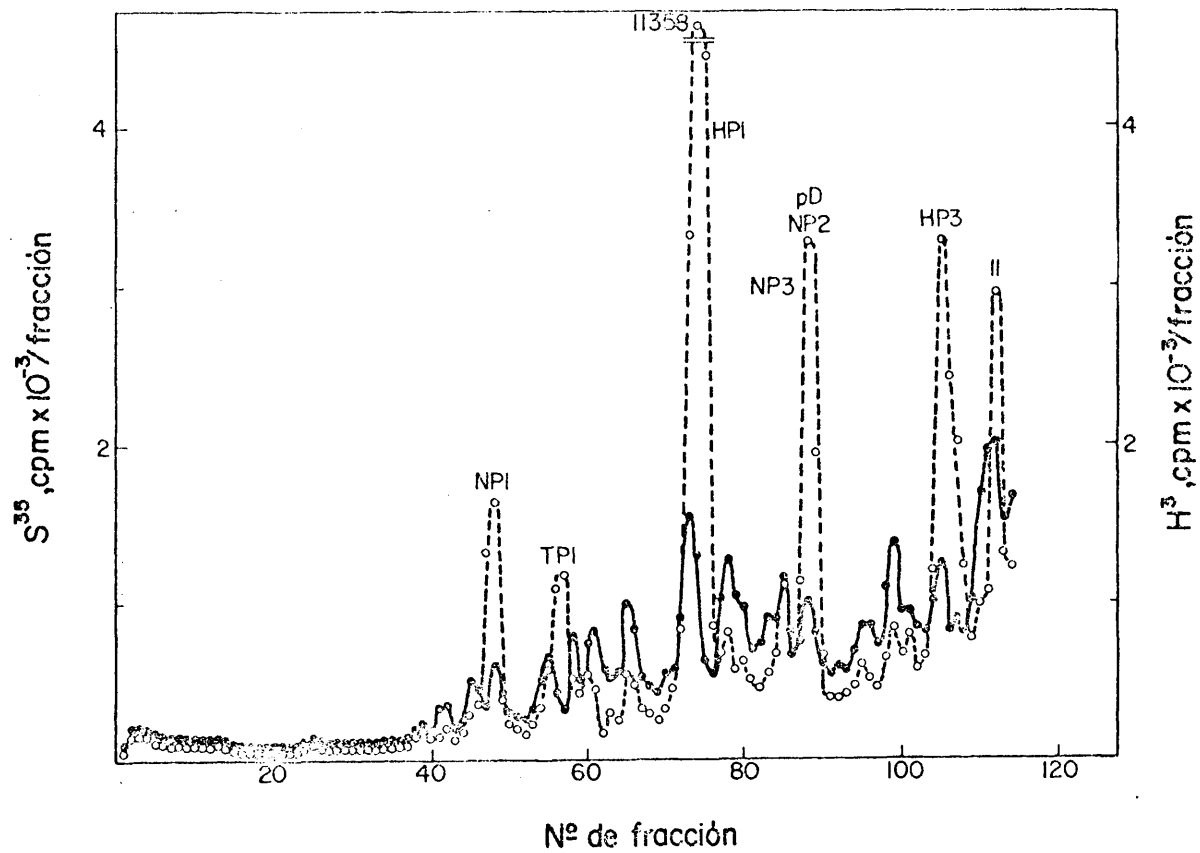


Figura 30.- Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis a 42°C.-

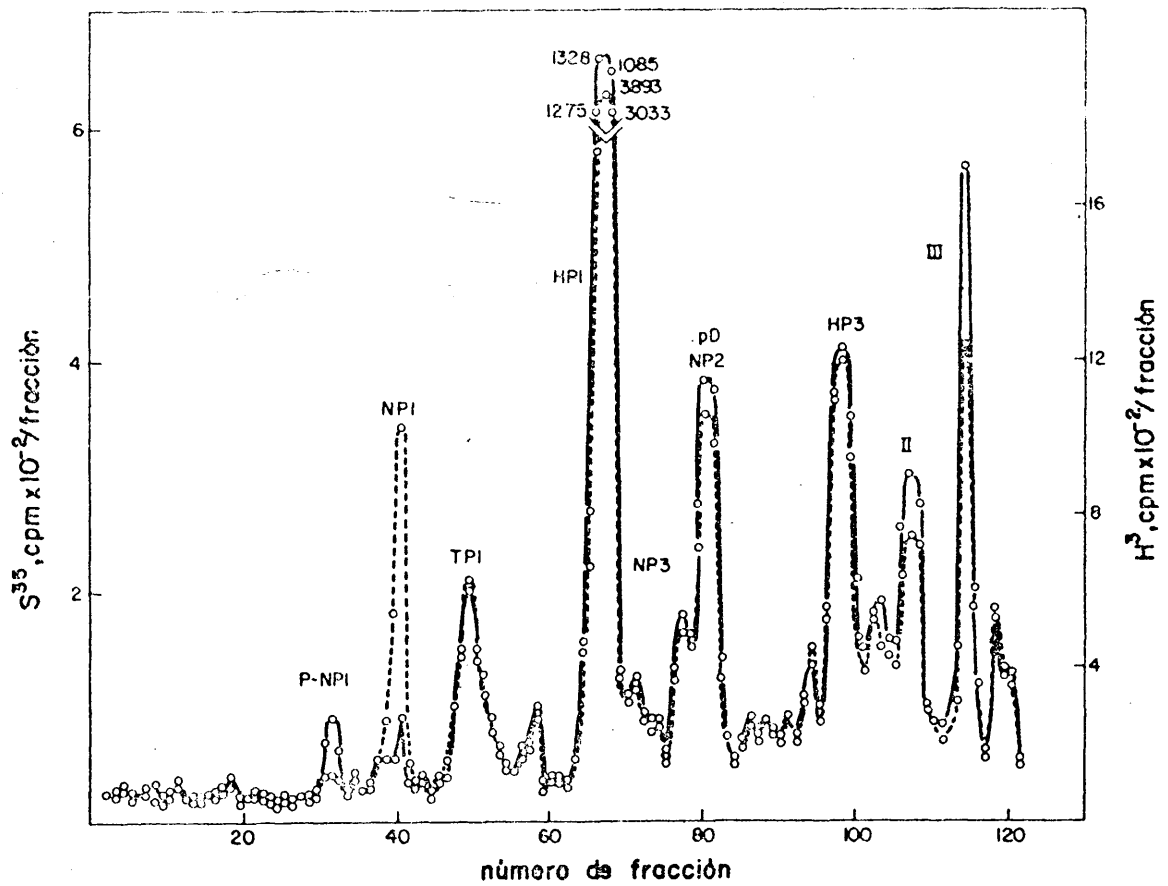


Figura 31.- Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis infectado con el mutante ts B66 a 42°C.-

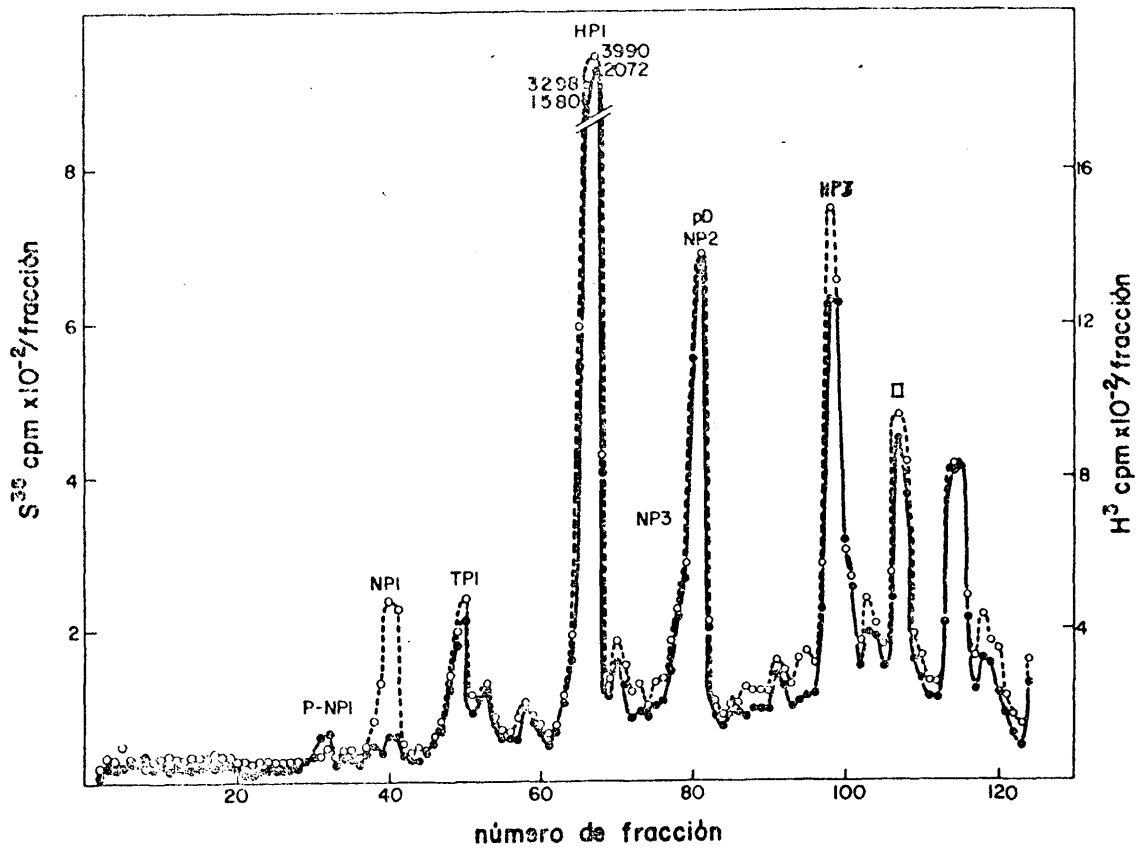


Figura 32.- Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis infectado con el mutante ts B74 a 42°C.-

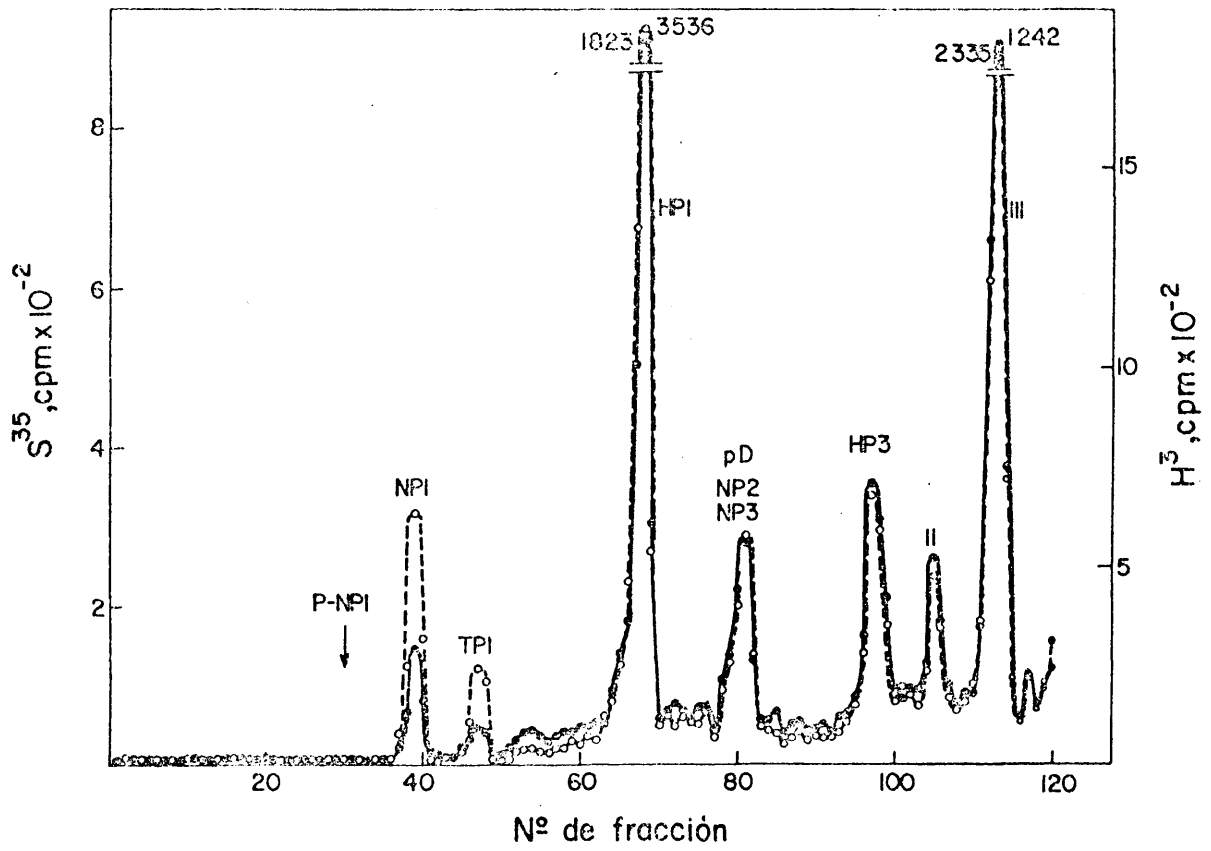


Figura 33.- Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis infectado con el mutante ts B73 a 30°C.-

Para demostrar que la transformación del precursor en los mutantes sensibles a temperatura era dependiente de ésta, se realizó un experimento control llevado a cabo en las mismas condiciones que los anteriormente descritos, excepto por la temperatura que fue 30°C.

La figura 33 muestra que en la infección con el mutante tsB73 en condiciones permisivas (30°C), se produce la transformación normal del precursor P-NP1 a proteína NP1, mientras que la infección a 42°C producía el bloqueo de esta transformación.

g) Peso molecular de las proteínas no estructurales inducidas por el fago Ø29.

Los pesos moleculares de las 12 proteínas no estructurales inducidas por el fago Ø29 en bacterias irradiadas se determinaron por electroforesis en geles de poliacrilamida de pH continuo (Métodos m, 1) en presencia del detergente SDS. En estas condiciones, las proteínas se recubren de detergente, quedando cargadas negativamente de manera uniforme. La movilidad en estas condiciones es

proporcional al peso molecular (95).

La figura 34 muestra las movilidades relativas de las proteínas inducidas, frente a las movilidades relativas calculadas con las proteínas marcadoras descritas en Métodos, o. Los valores de los pesos moleculares obtenidos oscilan entre 36.000 para la proteína pD (que coincide en movilidad con la proteína NP3) y 4.000 para la de menor peso molecular. El peso molecular total de las proteínas inducidas es 195.500 que equivale a un 35% del contenido de la información genética del DNA de  $\phi 29$  (tabla III). La denominada proteína IV no se ha detectado como proteína específica del fago en algunas ocasiones, ya que coincide en movilidad electroforética con una proteína bacteriana. Como por otra parte no se ha podido detectar como proteína específica del virus en electroforesis de pH discontinuo (Resultados, i), no se ha incluido como proteína inducida por  $\phi 29$  en la tabla III. El peso molecular de las siete proteínas estructurales del fago, obtenido por Mendez y col. en nuestro laboratorio (22) se muestra en la tabla como comparación, si bien como la proteína NP1 se

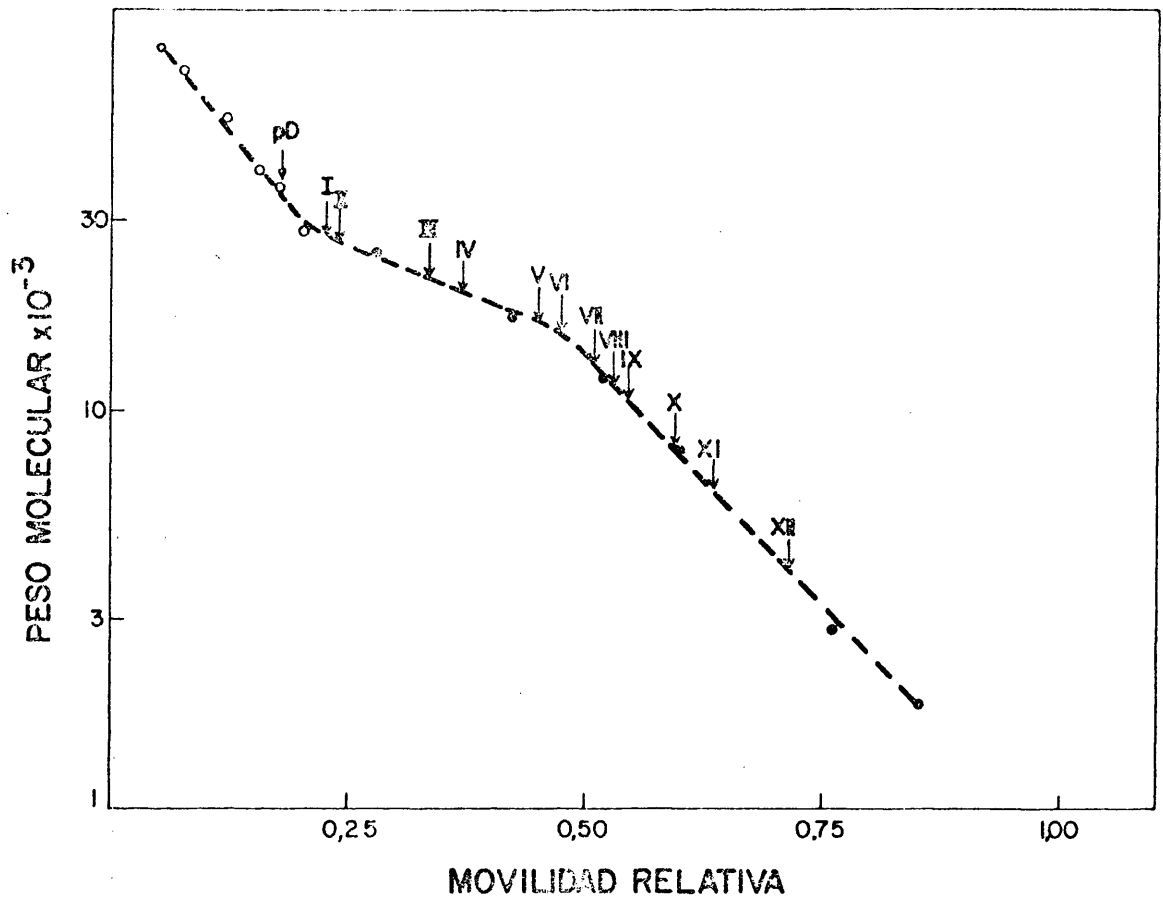


Figura 34. - Estimación del peso molecular de las proteínas no estructurales inducidas en *B. subtilis* infectado con  $\phi 29$ .



TABLA III. PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS INDUCIDAS  
POR EL FAGO Ø29.

| <u>Proteinas no</u><br><u>estructurales</u> | <u>Peso molecular</u> | <u>Proteinas</u><br><u>estructurales</u> | <u>Peso molecular</u> |
|---|-----------------------|--|-----------------------|
| pD  | 34.000                | P-NP1                                    | 90.000                |
| I   | 27.000                | TP1                                      | 71.000                |
| II  | 26.000                | HP1                                      | 54.000                |
| III   | 22.500                | HP2                                      | 48.000                |
| V   | 17.000                | NP2                                      | 40.000                |
| VI  | 16.000                | NP3                                      | 36.000                |
| VII   | 13.000                | HP3                                      | 28.000                |
| VIII  | 11.500                | Total                                    | <u>367.000</u>        |
| IX  | 10.500                |  |                       |
| X   | 8.000                 |  |                       |
| XI  | 6.000                 |  |                       |
| XII   | <u>4.000</u>          |  |                       |
| Total                                       | 195.500               |  |                       |

sintetiza en forma de precursor (P-NP1) de peso molecular 90.000 es este valor el que se ha incluido en la tabla. En total las proteínas estructurales representan un 60% de la información del DNA de  $\phi 29$ .

h) Proteínas sintetizadas *in vitro* en presencia del DNA del fago  $\phi 29$ .

Con el sistema acelular de E. coli obtenido como se describe en Métodos, k y dirigido por el DNA de  $\phi 29$  se consiguió síntesis de RNA, medida por la incorporación de UTP- $H^3$  en material insoluble en ácido tricloroacético (figura 35 a) y síntesis de proteínas, medidas por la incorporación de leucina- $H^3$  en material insoluble en ácido tricloroacético después de calentar 15 minutos a 90°C (figura 35 b). Como muestra la figura, hay una estimulación apreciable en la incorporación de ambos precursores marcados en material insoluble en ácido debida a la presencia del DNA de  $\phi 29$ .

Una de las actividades enzimáticas inducidas en B. subtilis infectado con el fago  $\phi 29$  es la actividad tipo

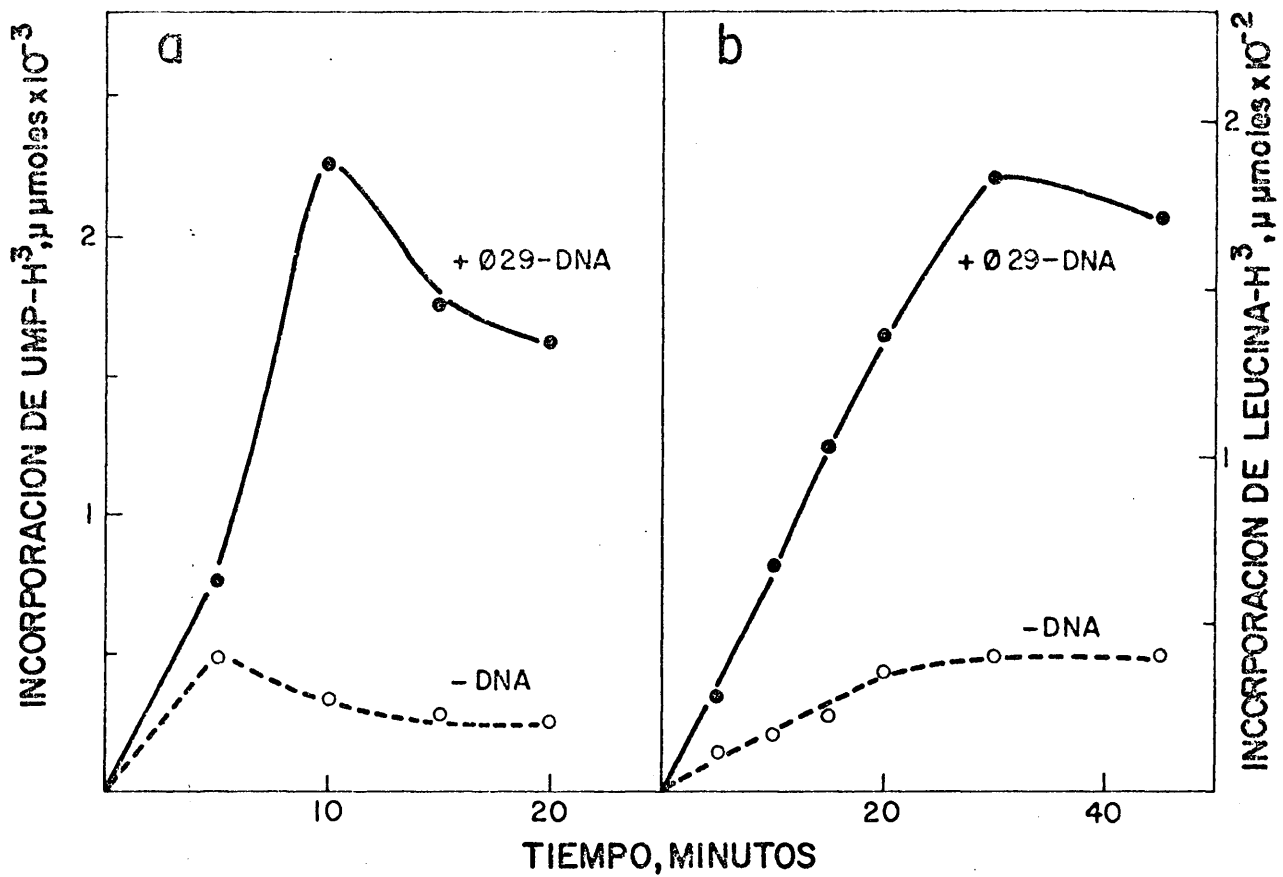


Figura 35.- Síntesis de RNA y proteína en un sistema libre de células de *E. coli*. -

lisozima (37). Actividades similares se han detectado en otros sistemas acelulares de E. coli dirigidos por el DNA de diferentes fagos (65, 66). Como control para nuestro sistema de síntesis de proteínas in vitro, se ensayó la síntesis de actividad tipo lisozima dirigida por el DNA de  $\phi 29$ .

La figura 36 muestra que después de un periodo de 10 minutos desde que comienza la reacción se empieza a sintetizar una actividad tipo lisozima capaz de liberar ácido diaminopimélico de la pared de E. coli, hasta alcanzar un máximo. Esta actividad no se puede detectar en un ensayo paralelo sin DNA.

Para comprobar que la actividad sintetizada in vitro no era proteasa, de un ensayo de síntesis de proteínas dirigido por DNA de  $\phi 29$  se tomaron alícuotas para ensayar actividad lisozima como se ha descrito en Métodos, 1, y otras alícuotas se ensayaron sobre filtros pretratados con lisozima de clara de huevo. La tabla IV muestra que mientras que en el sistema se detecta la

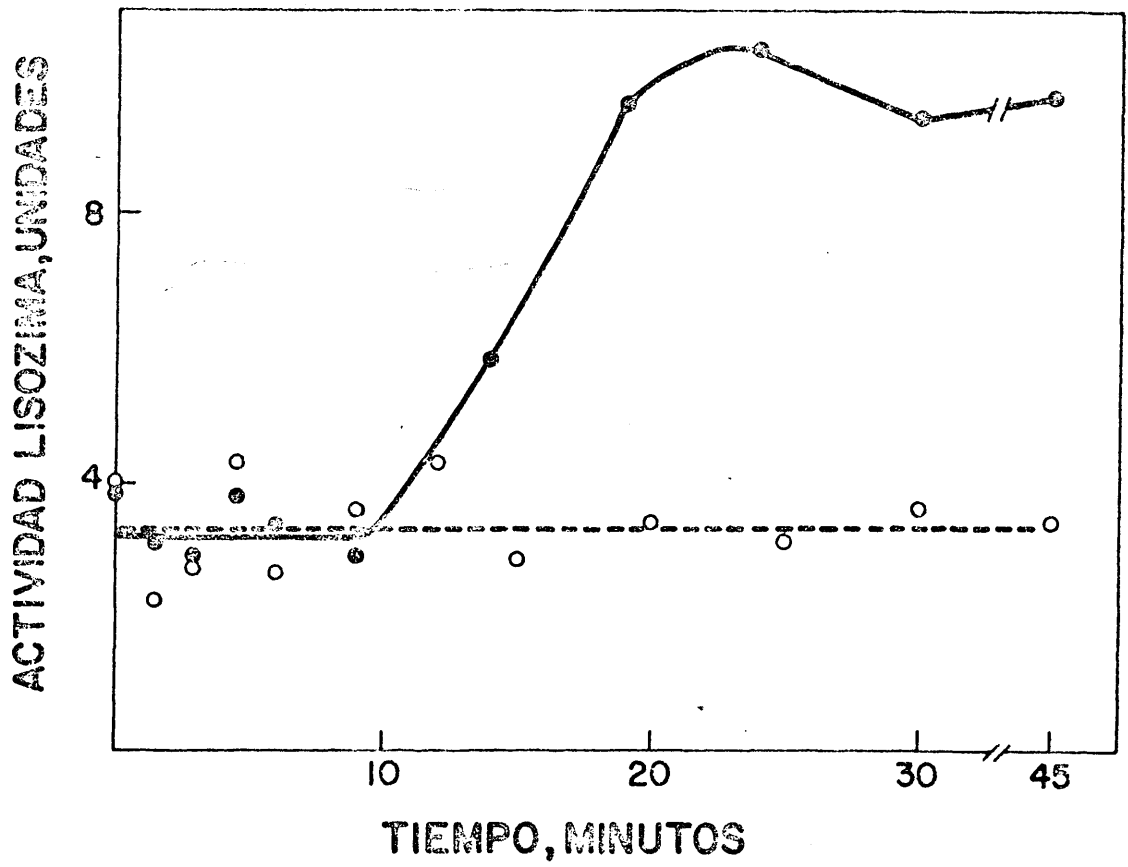


Figura 36. -Actividad tipo lizozima sintetizada en un sistema libre de células de E. coli dirigido por el DNA de  $\phi 29$ . -

TABLA IV. ENSAYO DE ACTIVIDADES LISOZIMA Y PROTEASA EN EL SISTEMA in vitro

| Tiempo de incubación | Actividad lisozima, cpm/200 $\mu$ l |       | Actividad proteasa, cpm/200 $\mu$ l |
|----------------------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|
|                      | + DNA $\phi$ 29                     | - DNA | + DNA $\phi$ 29                     |
| 0 min.               | 282                                 | 382   | 682                                 |
| 3 "                  | 321                                 | 286   | 464                                 |
| 10 "                 | 484                                 | 332   | 440                                 |
| 20 "                 | 744                                 | 288   | 486                                 |
| 30 "                 | 1059                                | 311   | 319                                 |

De la mezcla de síntesis de proteínas in vitro en presencia de DNA de  $\phi$ 29, se sacaron alícuotas a los tiempos indicados, y se incubaron a 37°C durante 24 horas con filtros conteniendo E. coli marcado con ácido  $\alpha, \epsilon$ -diaminopimélico- $H^3$  (para seguir actividad lisozima) ó con filtros pretratados con lisozima (para seguir actividad proteasa) y se determinó la radioactividad total liberada de los filtros en una alícuota de 200  $\mu$ l. Como control se siguió la actividad lisozima sintetizada en un ensayo sin DNA.

síntesis progresiva con el tiempo de incubación de una actividad lisozima, no aparece un aumento paralelo de actividad proteasa. En el control de las proteínas sintetizadas in vitro sin DNA, no apareció una síntesis progresiva con el tiempo de ninguna actividad.

Si la actividad sintetizada en el ensayo dirigido por el DNA de  $\phi 29$  fuera proteasa debía haber aparecido en el ensayo sobre filtros pretratados, ya que en filtros controles tratados con tripsina en las mismas condiciones (Métodos, 1, 2) se produjo una liberación de radioactividad del mismo orden que la producida por la lisozima de clara de huevo (tabla I).

Las proteínas sintetizadas in vitro, marcadas con leucina radioactiva, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe en Métodos m, 1.

La figura 37, muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas in vitro en presencia de DNA de  $\phi 29$  (marcadas con leucina- $C^{14}$ ) y las proteínas sinteti-

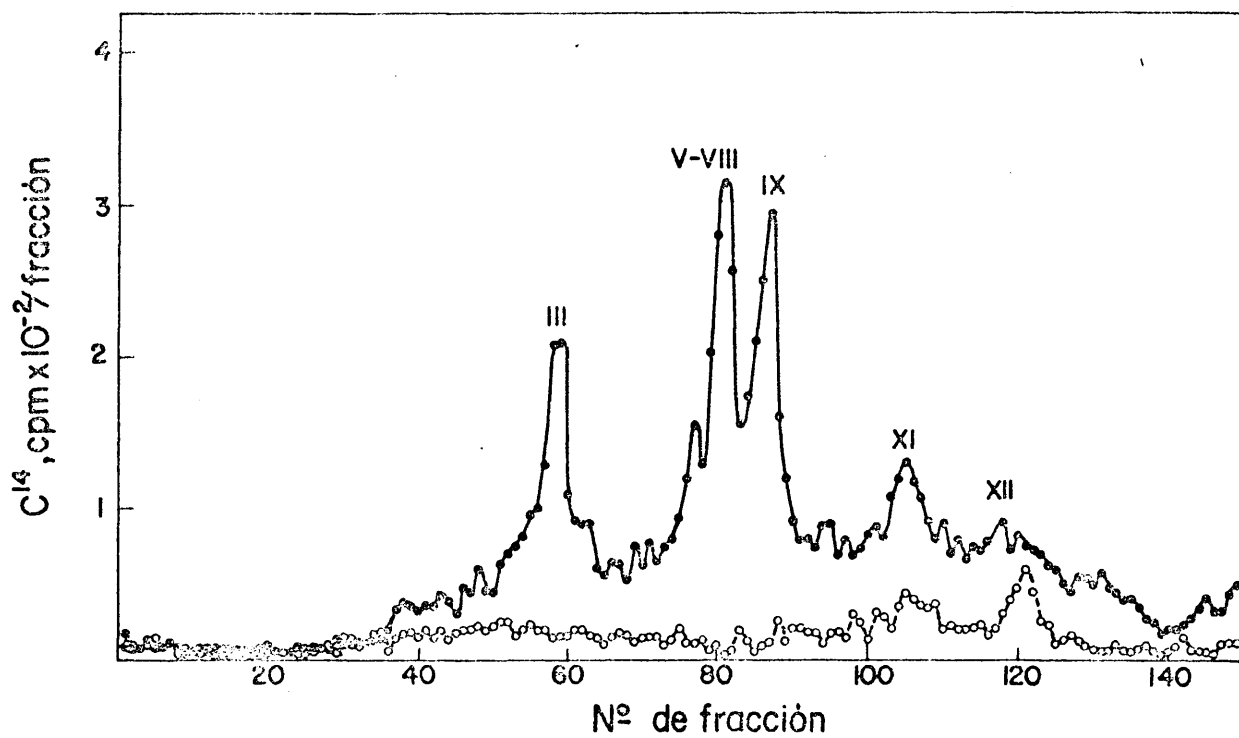


Figura 37.- Electroforesis de las proteínas sintetizadas in vitro en un sistema libre de células dirigido por el DNA de  $\phi 29$ .-



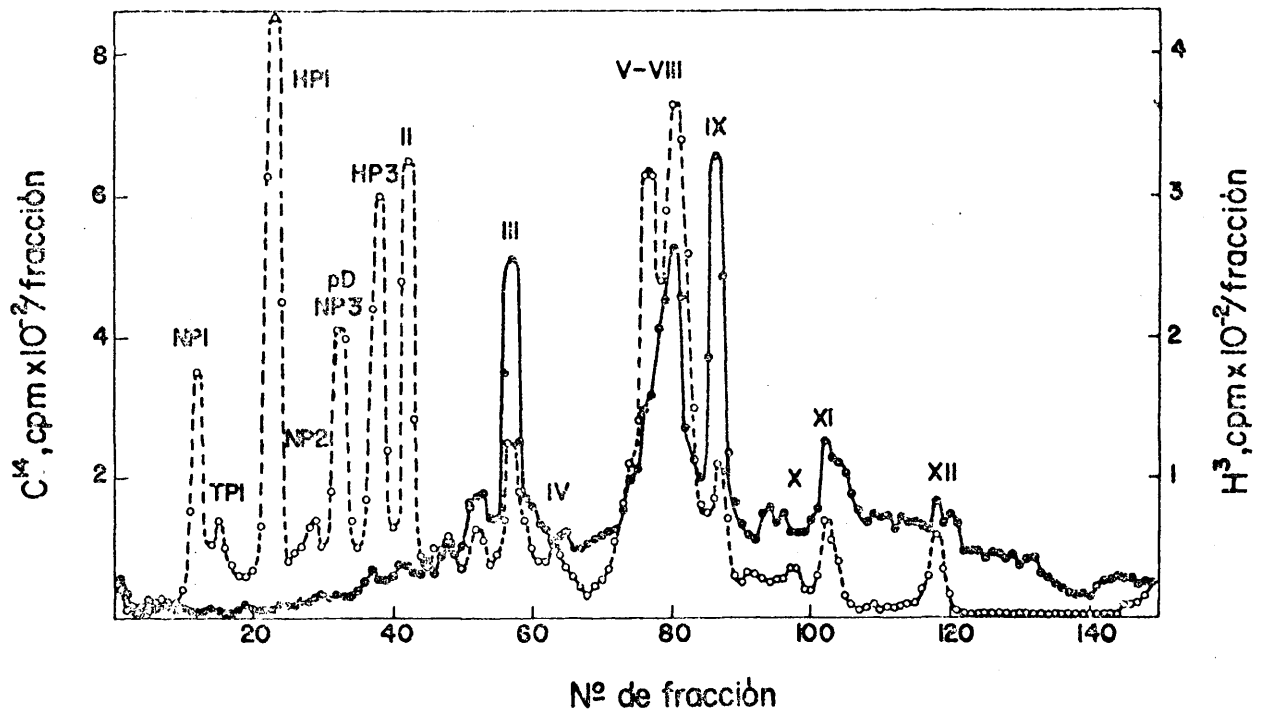


Figura 38. -Caracterización electroforética de las proteínas sintetizadas en un sistema libre de células dirigido por el DNA de  $\phi 29$ .

zadas en ausencia de DNA (marcadas con leucina- $H^3$ ). En el perfil electroforético correspondiente a las proteínas marcadas en el ensayo dirigido por DNA de  $\phi 29$  aparecen varios picos específicos.

En la figura 38, se muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas in vitro en presencia de DNA de  $\phi 29$ , marcadas con leucina- $C^{14}$ , y las proteínas sintetizadas in vivo en B. subtilis irradiado e infectado con  $\phi 29$ , marcadas en un pulso de 20 a 23 minutos con leucina- $H^3$ , como se ha descrito en Métodos, g. 2.

Las proteínas sintetizadas in vitro corresponden con las proteínas III, V a IX y XII sintetizadas in vivo. Todas las proteínas sintetizadas in vitro son tempranas, no apareciendo ninguna proteína tardía, estructural o no estructural.

i) Análisis de las proteínas sintetizadas por los mutantes sensibles a supresor de  $\phi 29$  en condiciones restrictivas.

B. subtilis 110 NA es una bacteria su<sup>-</sup> y por tanto no

permite el desarrollo normal de los mutantes sensibles a supresor (sus) del fago  $\phi 29$ .

Para analizar las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por los mutantes sensibles a supresor de  $\phi 29$ , B. subtilis 110NA se irradió con luz ultravioleta y se infectó como se describe en Métodos g, 6, con los mutantes F515, K91, O56, A422r3, E136r3, H542, B47, I44r3, L53, L55r3, M1241r3, N212, D241r3 y P112 de la colección de Moreno y cols (28), y con los mutantes R 629, Q626, J614 y G769 de la colección de Reilly y cols (26).

Los mutantes A422, E136, I44, L53, L55, M1241 y D24 se retrocruzaron tres veces con el fago  $\phi 29$  normal para eliminar posibles dobles mutaciones (Métodos, d).

La figura 39 muestra el mapa genético lineal de  $\phi 29$ , con el lugar donde están localizados los mutantes empleados en nuestros experimentos. Los mutantes de la colección de Reilly y cols. se han localizado en nuestro laboratorio (29) en relación con el mapa genético obtenido previamente (28).

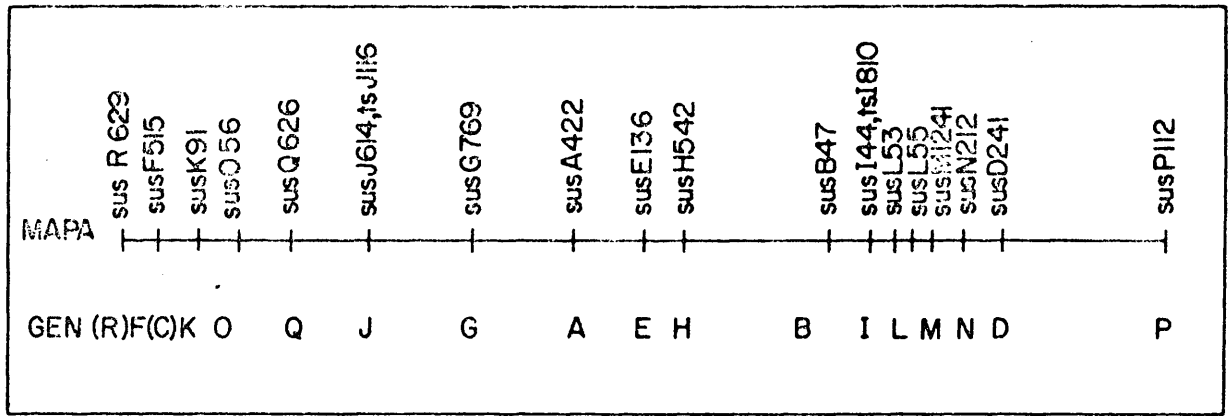


Figura 39.- Localización de los mutantes sensibles a supresor, sobre el mapa genético lineal de  $\phi 29$ . -

La figura 40 muestra el desarrollo de fago en las bacterias irradiadas e infectadas con  $\phi 29$  normal y con algunos de los mutantes empleados en nuestros experimentos.

La cinética de desarrollo obtenida para todos los mutantes empleados es similar a la mostrada en la figura para el mutante I44, lo que indica que no se desarrollaron, excepto en el caso de los mutantes M1241r3 y N212.

El mutante M1241r3 alcanza un rendimiento de fagos por bacteria infectada ligeramente superior al obtenido por infección con  $\phi 29$  normal, pero su cinética de desarrollo es mucho más lenta. Una particularidad de este mutante es que en las condiciones empleadas en estos experimentos no lisa las bacterias que infecta, y puede que ésta sea la razón de su alto rendimiento final en términos de fago obtenido por bacteria infectada.

En el caso del mutante N212 se aprecia también un retraso anormal en el desarrollo respecto al control in-

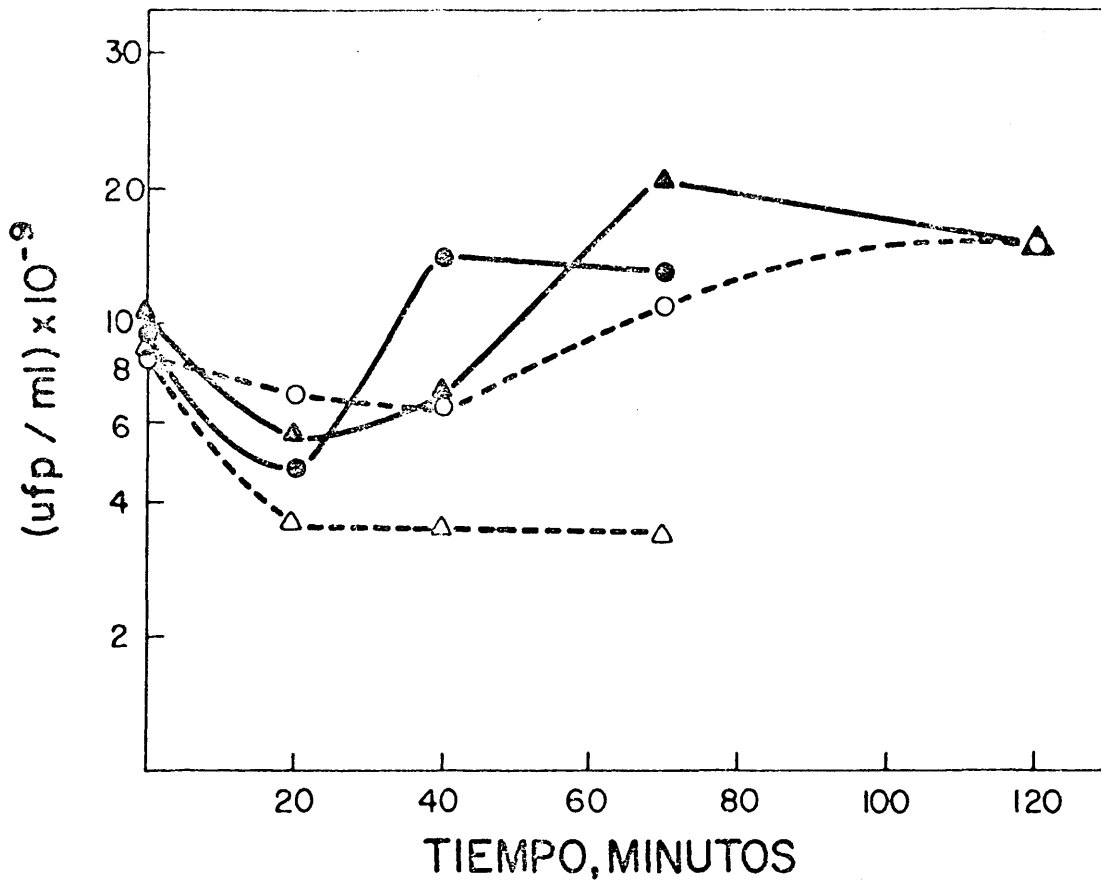


Figura 40. - Desarrollo de mutantes sus en B. subtilis 110NA . -

fectado con  $\phi 29$  normal. También este mutante en las condiciones empleadas tarda mucho tiempo en lisar las bacterias que infecta (aproximadamente dos veces más que el fago normal).

Las bacterias infectadas con cada uno de los mutantes, se marcaron a dos tiempos distintos con aminoácidos radioactivos como se describe en Métodos g, 6. El primer pulso se realizó entre los 5 y 13 minutos después de la infección para analizar las proteínas tempranas inducidas por los mutantes, y el segundo pulso entre los 20 y 28 minutos para analizar las proteínas tardías.

En el caso de los mutantes Q626 y M1241r3 fue necesario marcar las bacterias infectadas con un pulso adicional entre los minutos 35 y 43 debido a que la síntesis de sus proteínas parece ir considerablemente retrasada respecto al resto de los mutantes.

Las proteínas marcadas en las bacterias infectadas con los mutantes ya citados así como los controles co-

rrespondientes a bacterias sin infectar e infectadas con  $\phi 29$  normal, se sometieron a electroforesis en placas de gel de poliacrilamida de pH discontinuo, en los que el gel separador tenía un gradiente de acrilamida entre el 10 y el 20% (Métodos m, 3).

En el sistema de electroforesis empleado, las proteínas caracterizadas se han nombrado con la letra correspondiente al gen que determina a la proteína como se verá más adelante, excepto en el caso de las proteínas en las que no se conoce el gen que las especifica, que se han nombrado con números árabes del 1 al 5. Esta asignación gen-proteína se detalla más adelante en este mismo apartado.

La figura 41 muestra la densitometría correspondiente a las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA infectado con  $\phi 29$ , marcadas con leucina- $C^{14}$  en un pulso de 5 a 13 minutos, frente a las proteínas sintetizadas por la bacteria sin infectar, marcadas en idénticas condiciones. Como puede verse aparecen 9 proteínas espe-



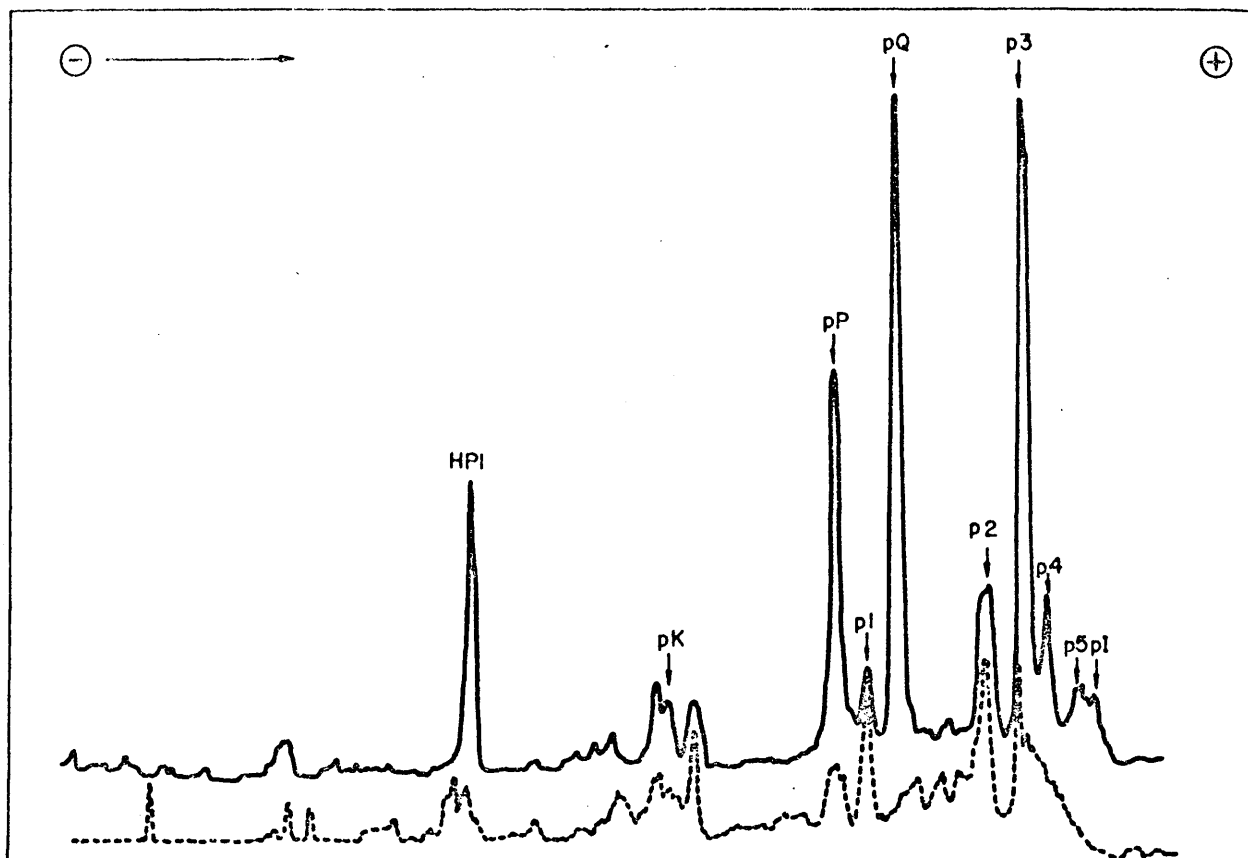


Figura 41.- Densitometría de las proteínas tempranas inducidas en *B. subtilis* infectado con  $\phi 29$ , analizadas por electroforesis en pH discontinuo y autorradiografía.-

cíficas de la bacteria infectada (pK, pP, pQ, pI, p1, p2, p3, p4 y P5). Las proteínas p1 y p2 se consideran específicas del fago aunque coincidan en movilidad con proteínas de la bacteria debido a que son sintetizadas en un sistema acelular de síntesis de proteínas de E. coli, dirigido por el DNA de  $\phi 29$  (101). En este pulso aparece algo de proteína HP1, cuya síntesis aumenta considerablemente en el pulso tardío, a diferencia de lo que sucede con las proteínas tempranas (figura 42).

La correlación entre las proteínas tempranas caracterizadas en el sistema de electroforesis de pH continuo y las caracterizadas en el sistema de gradiente de acrilamida y pH discontinuo se puede realizar de acuerdo con el peso molecular, de manera que las llamadas proteínas I y III corresponden con las proteínas pK y pP respectivamente. La zona de proteínas V-IX, que en el sistema de electroforesis de pH continuo se resolvía pobremente, en el sistema de pH discontinuo se resuelve claramente en cinco proteínas, que se han denominado pQ, 1, 2, 3 y 4.

La proteína XI corresponde con la proteína p5 del sistema de pH discontinuo y la XII con la proteína pI.

La figura 42 muestra la densitometría de las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA infectado con  $\phi 29$ , marcadas con leucina- $C^{14}$  en un pulso de 20 a 28 minutos, frente a las proteínas marcadas en idénticas condiciones en B. subtilis 110NA sin infectar.

La posición de las proteínas estructurales en la autorradiografía se determinó haciendo electroforesis en las mismas condiciones de fago  $\phi 29$  purificado y marcado con leucina- $C^{14}$  (Métodos f). La figura 42 muestra que además de las proteínas estructurales del fago (NP1, TP1, HP1 y HP2, NP3, NP2 y HP3), en bacterias infectadas aparecen otras tres proteínas: la proteína pD (que en el sistema de electroforesis de pH continuo no se podía separar de la proteína NP3), la proteína pN que corresponde con la proteína II de las caracterizadas en electroforesis de pH continuo, y la proteína pJ que debe corresponder con la proteína tardía X caracterizada en Resultados, b. También aparece una pro-

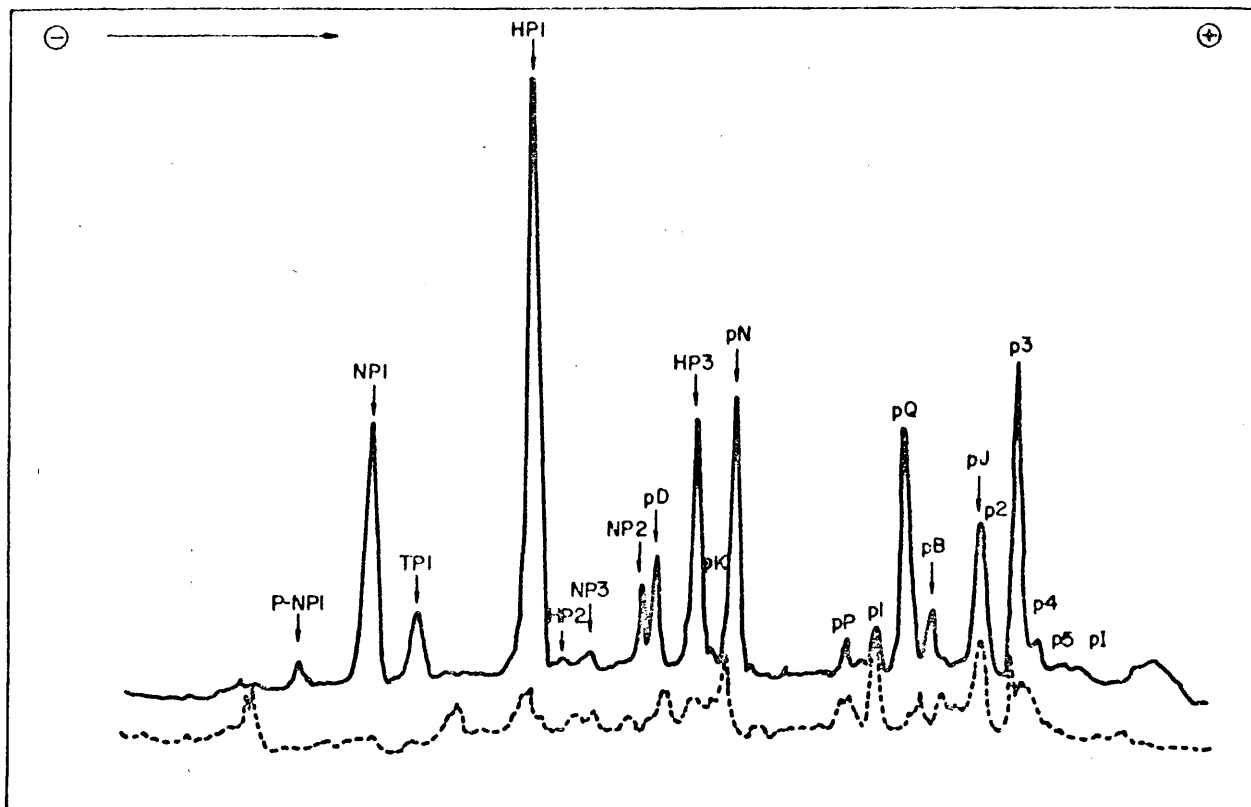


Figura 42. -Densitometría de las proteínas tardías inducidas en *B. subtilis* infectado con  $\phi 29$ , analizadas por electroforesis en pH discontinuo y autorradiografía. -

teína de movilidad electroforética en la zona de peso molecular aproximado de 10.000. Esta proteína no aparece cuando se infecta B. subtilis 110NA con mutantes sus en el cistrón B. Estos datos parecen indicar que esta proteína es el fragmento producido en la transformación de la proteína P-NP1 a NP1.

Para determinar la posición de la proteína NP3 (figura 43), se comparó la autorradiografía de las proteínas estructurales del fago  $\phi 29$  purificado, y las proteínas estructurales de las cabezas vacías que aparecen en los lisados obtenidos cuando se infecta con  $\phi 29$ , marcadas y purificadas como se describe en Métodos f, ya que la proteína NP3 está ausente de las cabezas vacías (22). Como se indica en la figura, la movilidad de la proteína NP3 en el sistema de pH discontinuo está alterada respecto a la movilidad de esta proteína en el sistema de electroforesis de pH continuo (98).

La figura 44 muestra la autorradiografía correspondiente a la electroforesis de las proteínas marcadas en un

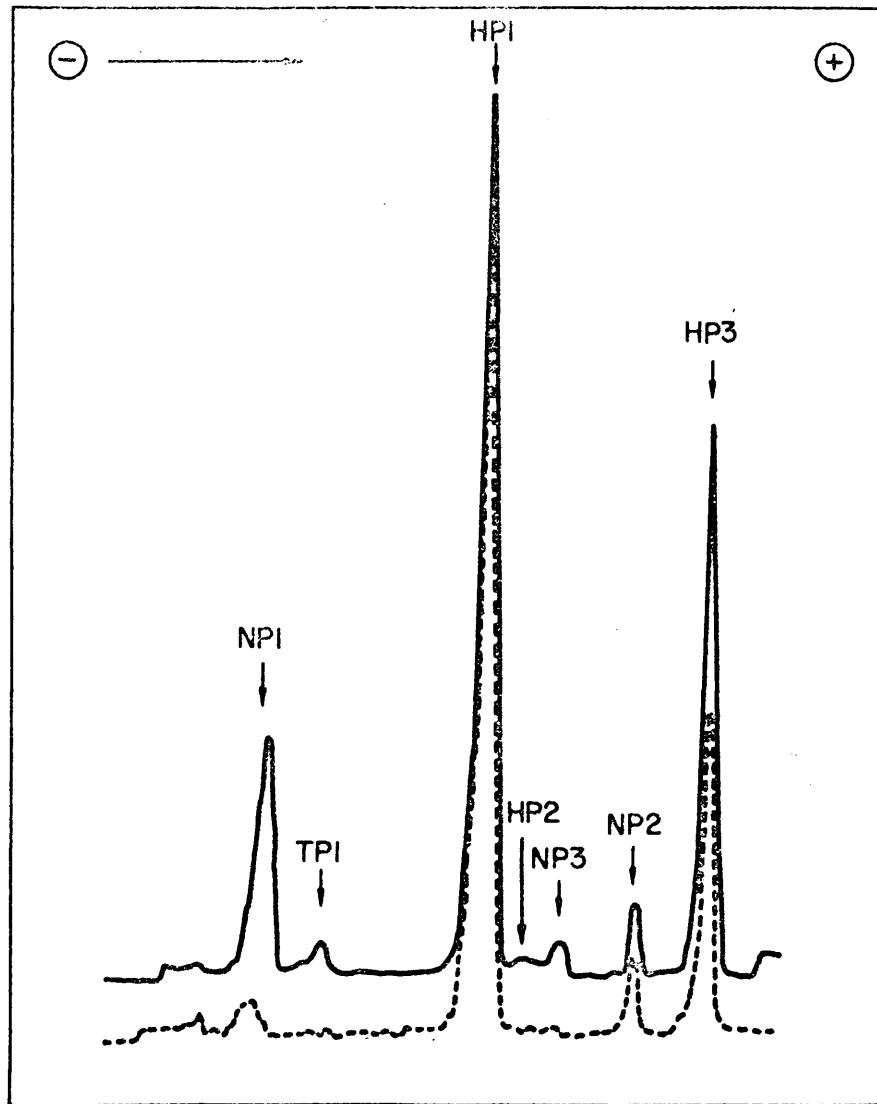


Figura 43. - Densitometría de las proteínas estructurales del fago  $\phi 29$  y de cabezas vacías del fago. -

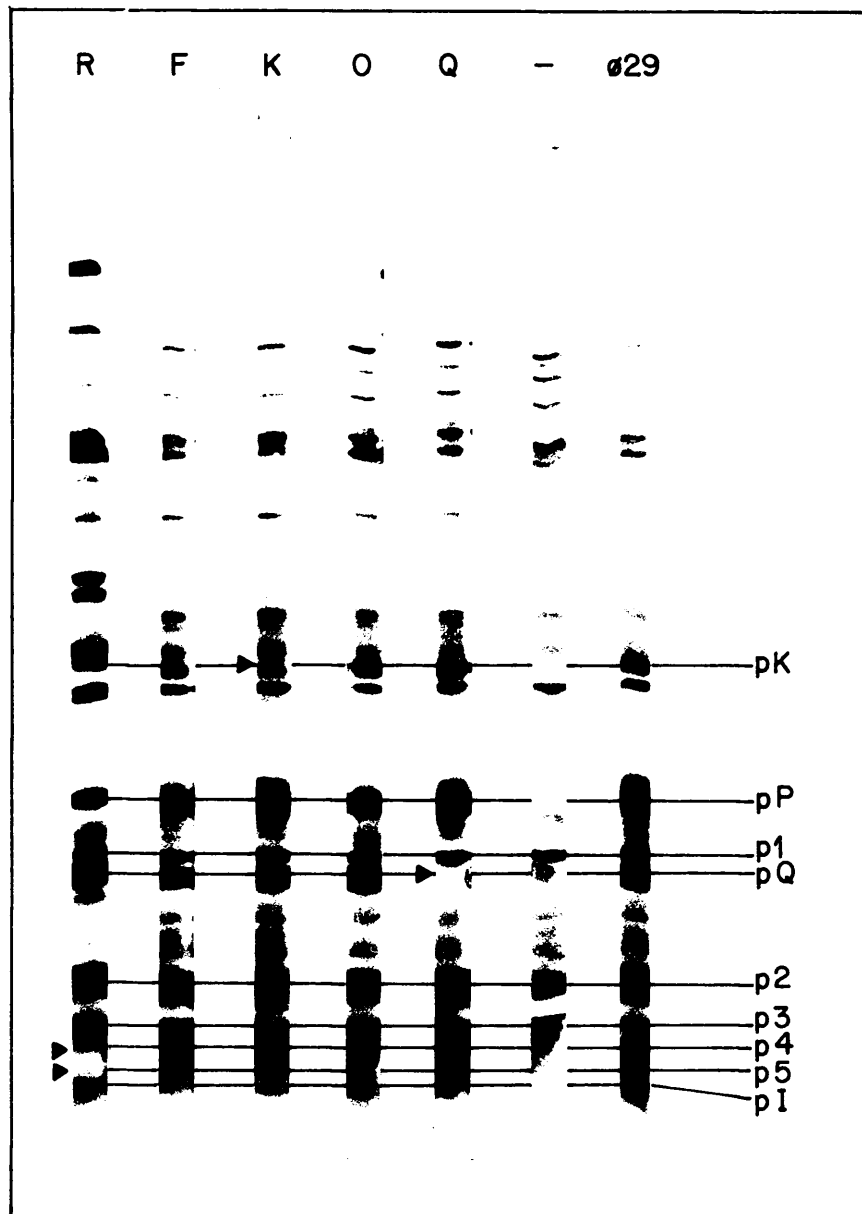


Figura 44.- Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus R629, sus F515, sus K91, sus O56 y sus Q26, marcadas en un pulso temprano.-

pulso de 5 a 13 minutos después de la infección de B. subtilis 110 NA con los mutantes R629, F515, K91, O56 y Q626, frente a un control de las proteínas sintetizadas por el fago  $\phi$ 29 normal.

El mutante sus R629 presenta las mismas proteínas que el control infectado con  $\phi$ 29 normal, excepto dos proteínas tempranas de bajo peso molecular (p3 y p4).

Los mutantes F515 y O56 inducen aparentemente las mismas proteínas que el control de fago  $\phi$ 29 normal. El mutante K91, induce todas las proteínas tempranas inducidas por  $\phi$ 29 normal menos una de movilidad algo menor que la proteína estructural HP3. La proteína ausente en la infección con el mutante sus K91, se llamó pK.

En la infección con el mutante Q626, se detectan todas las proteínas inducidas por el fago normal, excepto una proteína temprana mayoritaria (pQ).

La figura 45 muestra la autorradiografía de las proteínas sintetizadas después de la infección con los mutantes



sus R629, F515, K91, O56 y Q626, así como los controles de bacteria sin infectar e infectada con  $\phi$ 29 normal, marcadas en un pulso de 20 a 28 minutos para analizar las proteínas tardías, y un pulso adicional del mutante Q626 marcado entre los 35 y 43 minutos, ya que la síntesis de proteínas tardías en este mutante parece realizarse más lentamente y a niveles bajos. Los mutantes R629, F515, K91 y Q626 presentan todas las proteínas tardías estructurales y no estructurales que aparecen en el pulso del control infectado con  $\phi$ 29 normal y las proteínas tempranas aparecen disminuídas. Además siguen sin sintetizarse las proteínas pK, p3 y p4 y pQ en los mutantes K91, R629 y Q626, respectivamente.

El mutante O56 no sintetiza ninguna proteína tardía, ya sea estructural ó no estructural, a pesar de que parece sintetizar todas las proteínas inducidas por el fago normal en el pulso temprano.

La figura 45 muestra la autorradiografía correspon-

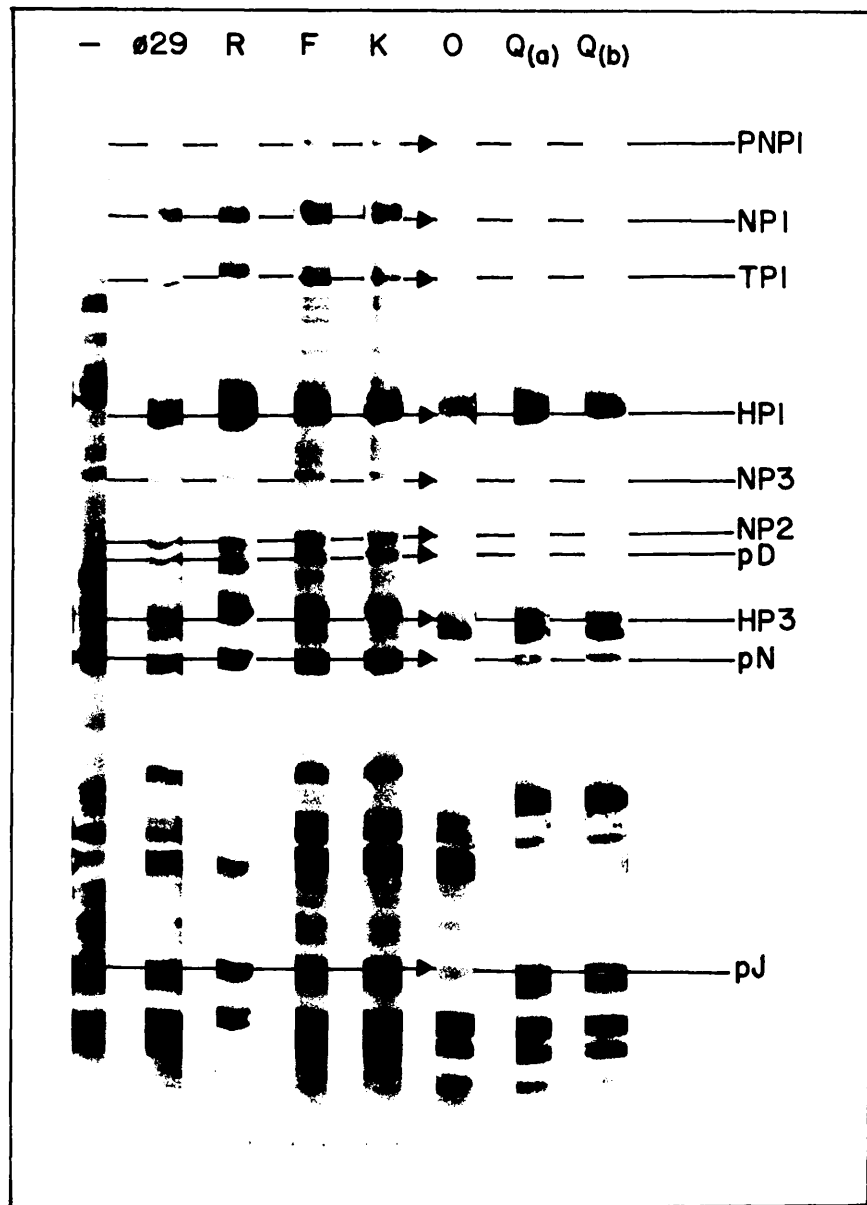


Figura 45.- Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus R629, sus F515, sus K91, sus O56 y sus Q62 marcadas en un pulso tardío.-

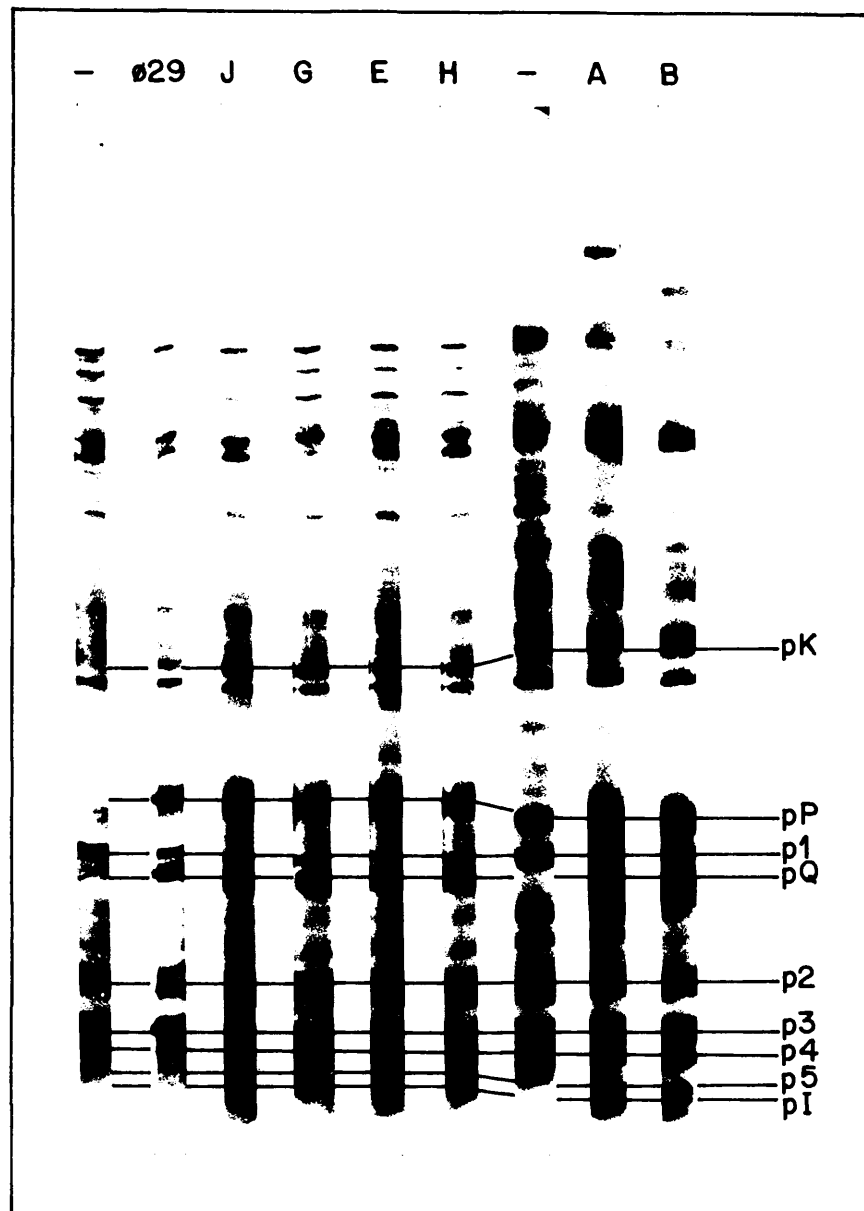


Figura 46.- Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus J614, sus G769, sus A422r3, sus E136r3, sus H542 y sus B47, marcadas en un pulso temprano.-

diente a la electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA por los mutantes J614, G769, A422r3, E136r3, H542 y B47, marcadas en un pulso de los 5 a los 13 minutos después de la infección. En todos los mutantes aparecen las mismas proteínas que en el control infectado con  $\phi 29$  normal.

La figura 47 muestra la autorradiografía correspondiente a las proteínas inducidas por estos mutantes marcadas en un pulso de los 20 a los 28 minutos después de la infección. El mutante J614 no induce una proteína de bajo peso molecular que aparece en los pulsos tardíos de bacterias infectadas con  $\phi 29$  normal. Esta proteína se denomina pJ. Además, aparece la proteína que forma las fibras de la cabeza (HP3) con una movilidad algo mayor de la que aparece en el lisado obtenido con  $\phi 29$  normal.

La infección con el mutante G769, induce todas las proteínas presentes en un lisado control infectado con  $\phi 29$  normal, excepto las proteínas estructurales HP1 (mayoritaria de la cápsida) y HP3 (fibras).

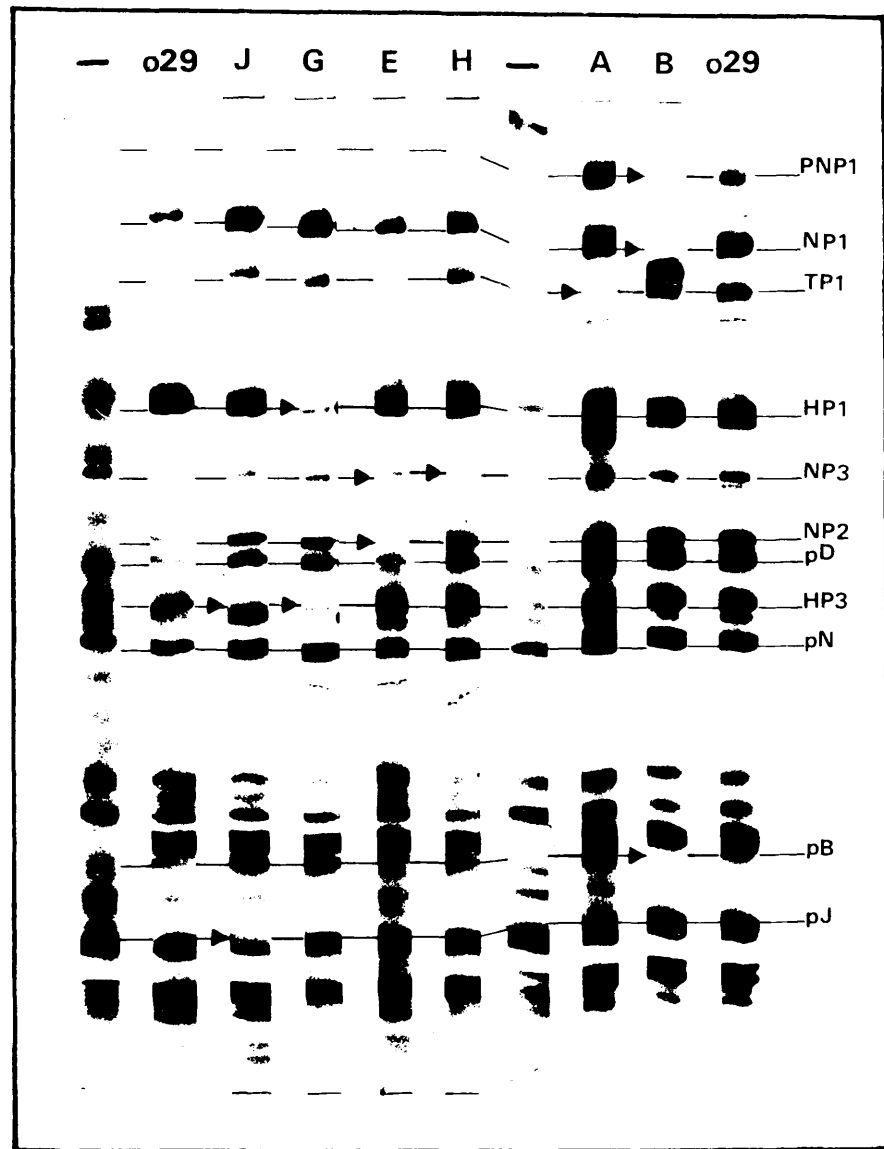


Figura 47.- Autorradiografía de las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por los mutantes sus J614, sus G769, sus A422r3, sus E136r3, sus H542 y sus B47, marcadas en un pulso tardío.-

las sintetizadas por los dos mutantes E y H, se realizaron experimentos de doble marca con leucina-C<sup>14</sup> y H<sup>3</sup> en condiciones restrictivas, como se describe en Métodos g, 6. Las proteínas sintetizadas por los mutantes E136r3 y H542 así como las inducidas por Ø29 normal se marcaron con leucina-C<sup>14</sup> y se mezclaron con alícuotas iguales de cultivos bacterianos sin infectar marcados con leucina-H<sup>3</sup>, para someterlos a electroforesis en geles cilíndricos de gradiente de acrilamida entre el 10 y el 20% (Métodos m, 2).

La figura 48 muestra la coelectroforesis de las proteínas inducidas por Ø29 normal frente a las proteínas presentes en la bacteria sin infectar. Si se calcula la radioactividad específica debida a proteínas inducidas por el fago mediante el método de Mayol y col (99), como se describió en Resultados, c, se define la presencia de la proteína NP3 y su posición en el gel ( figura 49). La figura 50 muestra la coelectroforesis de las proteínas inducidas por el mutante E136r3 frente a las proteínas estructurales del fago Ø29 purificado y marcado con una mezcla de aminoácidos-H<sup>3</sup> como se describe en Métodos, f.

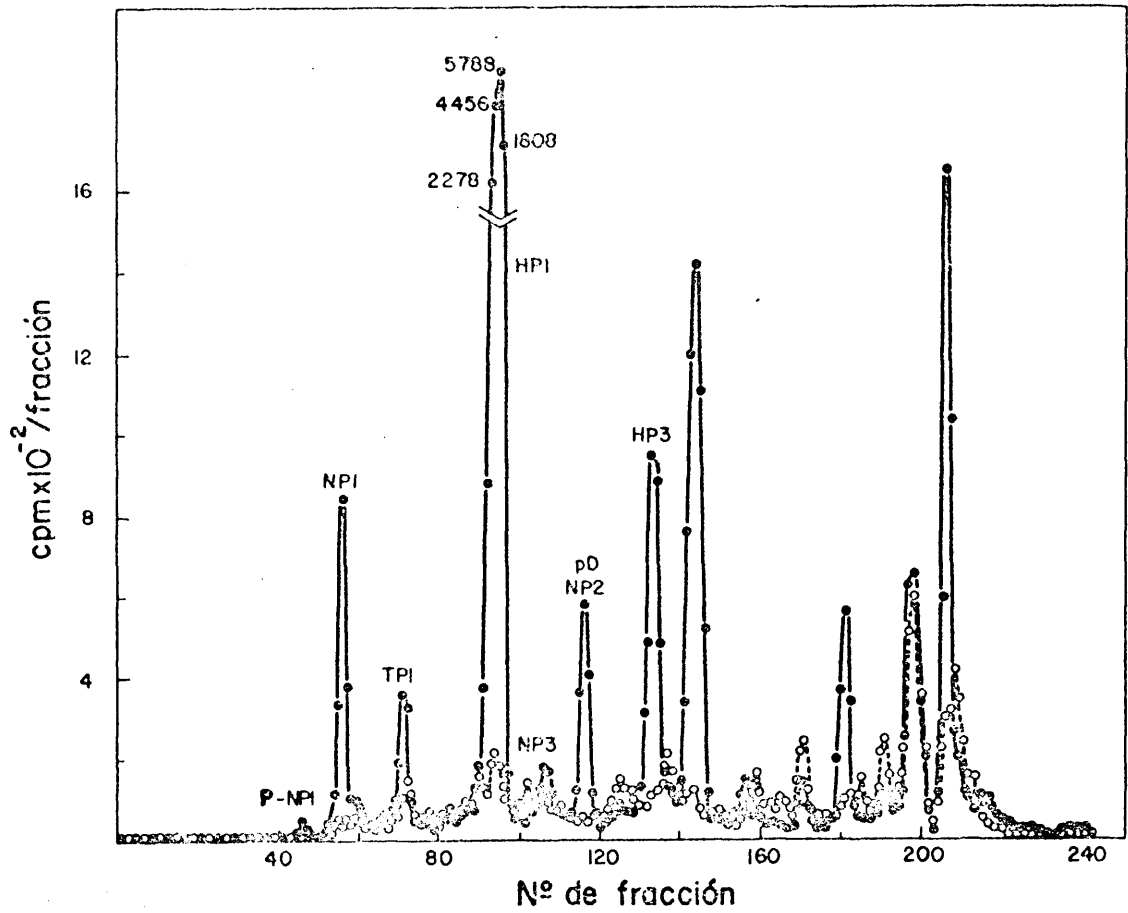


Figura 48.- Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA infectado con el fago  $\phi 29$ .-

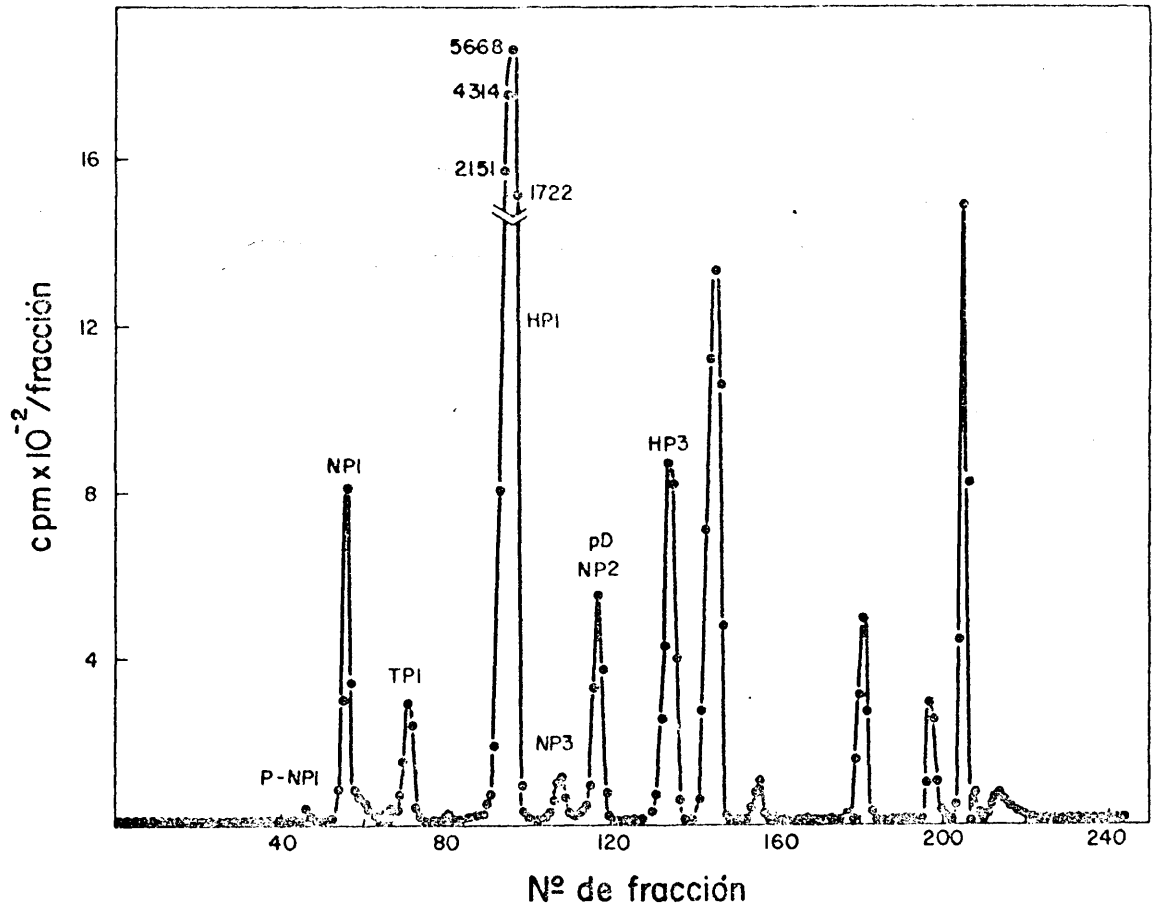


Figura 49. - Radioactividad específica de  $\phi 29$  en geles de gradiente de acrilamida. -



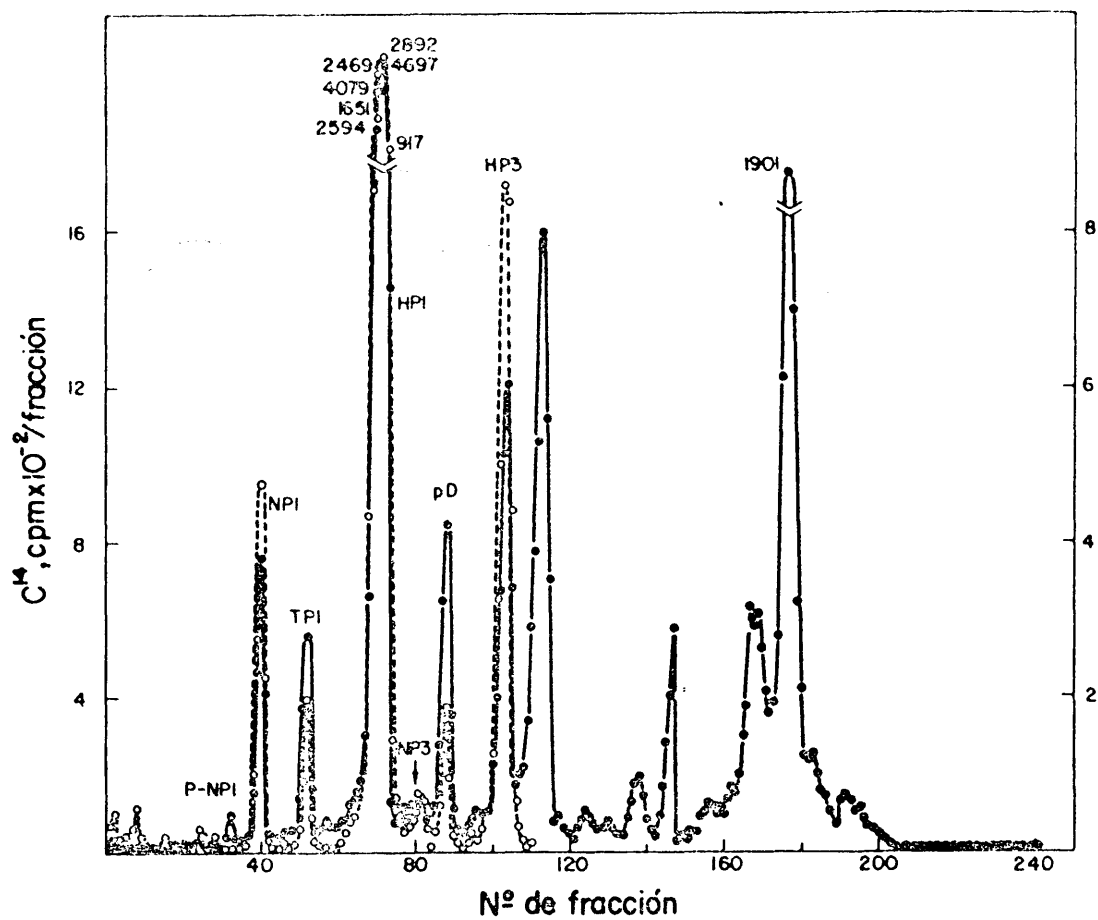


Figura 50.-Coelectroforesis de las proteínas inducidas por el mutante sus E136r3 frente a las proteínas estructurales del fago  $\phi 29$ . -

En la posición de la proteína NP3, no aparece un pico definido de proteína inducida por el mutante. La coelectroforesis de las proteínas inducidas por el mutante E136r3 frente a las proteínas de la bacteria sin infectar se muestra en la figura 51. Cuando se calcula la radioactividad específica de proteínas inducidas por el fago no aparece un pico definido de proteína en la posición de la proteína NP3. (figura 52).

La figura 53 muestra la coelectroforesis de las proteínas inducidas por el mutante H542 marcadas con leucina- $C^{14}$ , frente a las proteínas estructurales de  $\phi 29$  normal marcadas con aminoácidos- $H^3$ . La proteína NP3 señalada por el marcador de fago- $H^3$  no corresponde con un pico de proteína inducida por el mutante. La figura 54 muestra la coelectroforesis del control de proteínas de la bacteria sin infectar frente a las inducidas por el mutante H542. Si se calcula la radioactividad específica de fago por el método de Mayol y col. no aparece proteína NP3 entre las inducidas por el mutante H542 (figura 55).

La figura 56 muestra la autorradiografía de las proteínas sintetizadas por los mutantes I44r3, L53, L55r3,

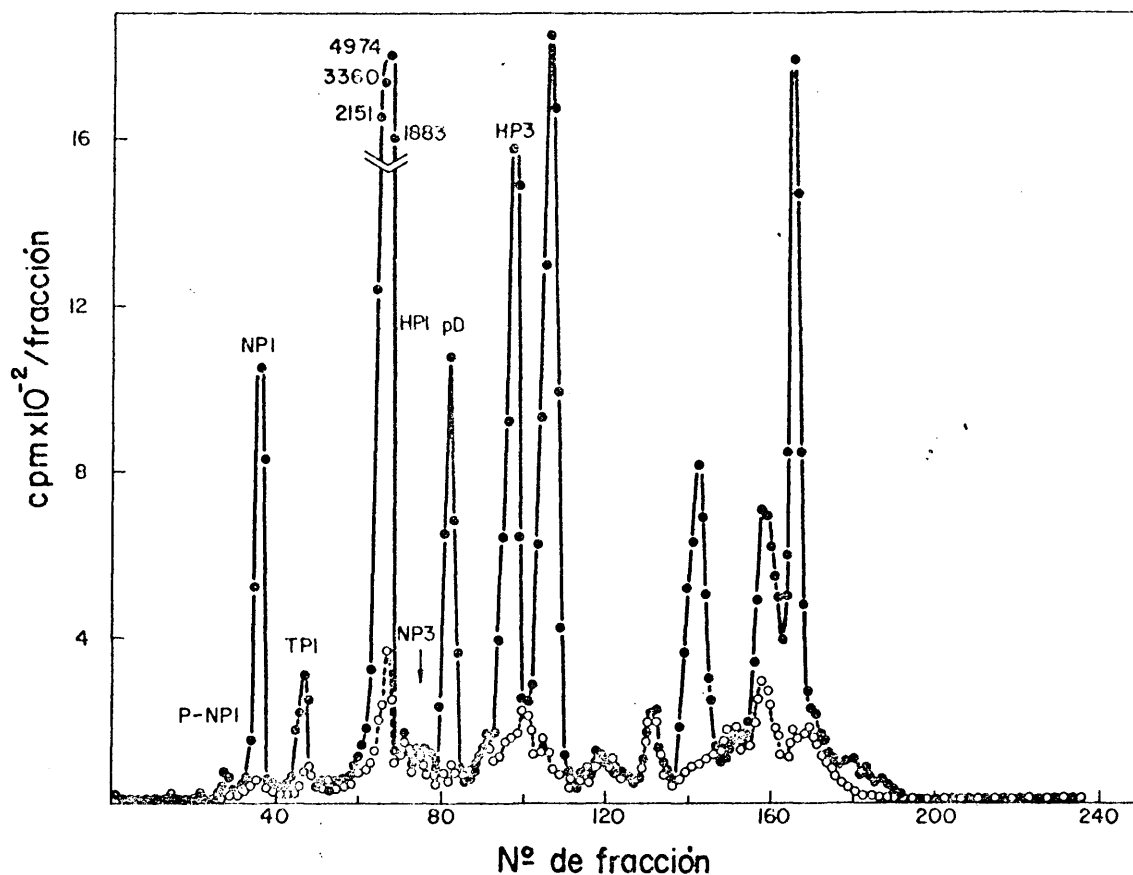


Figura 51] - Coelectroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA infectado con el mutante sus E136r3 y de las proteínas marcadas en bacterias sin infectar. -

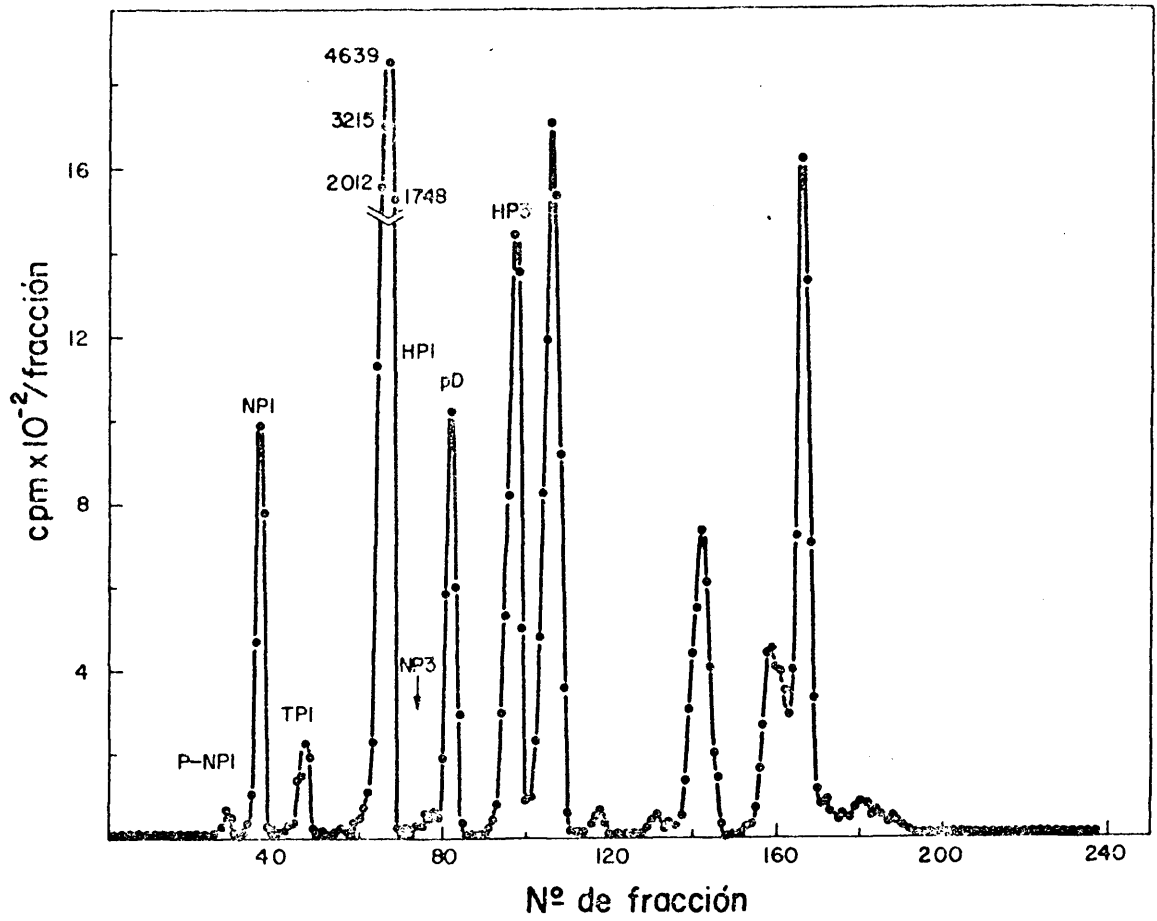


Figura 52.- Radioactividad específica del mutante sus E136r3 en gels de gradiente de acrilamida.-

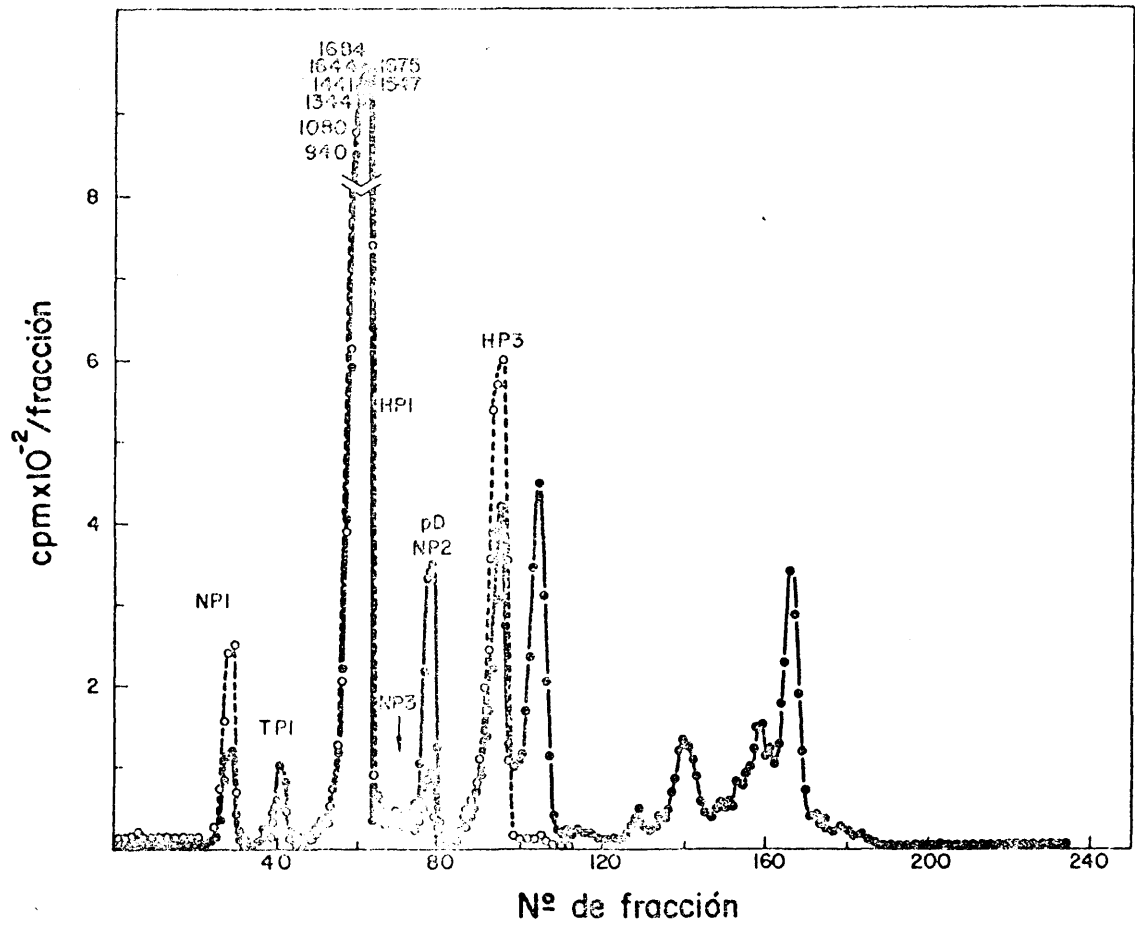


Figura 53. -Coelectroforesis de las proteínas inducidas por el mutante sus H542 frente a las proteínas estructurales del fago  $\phi$ 29. -

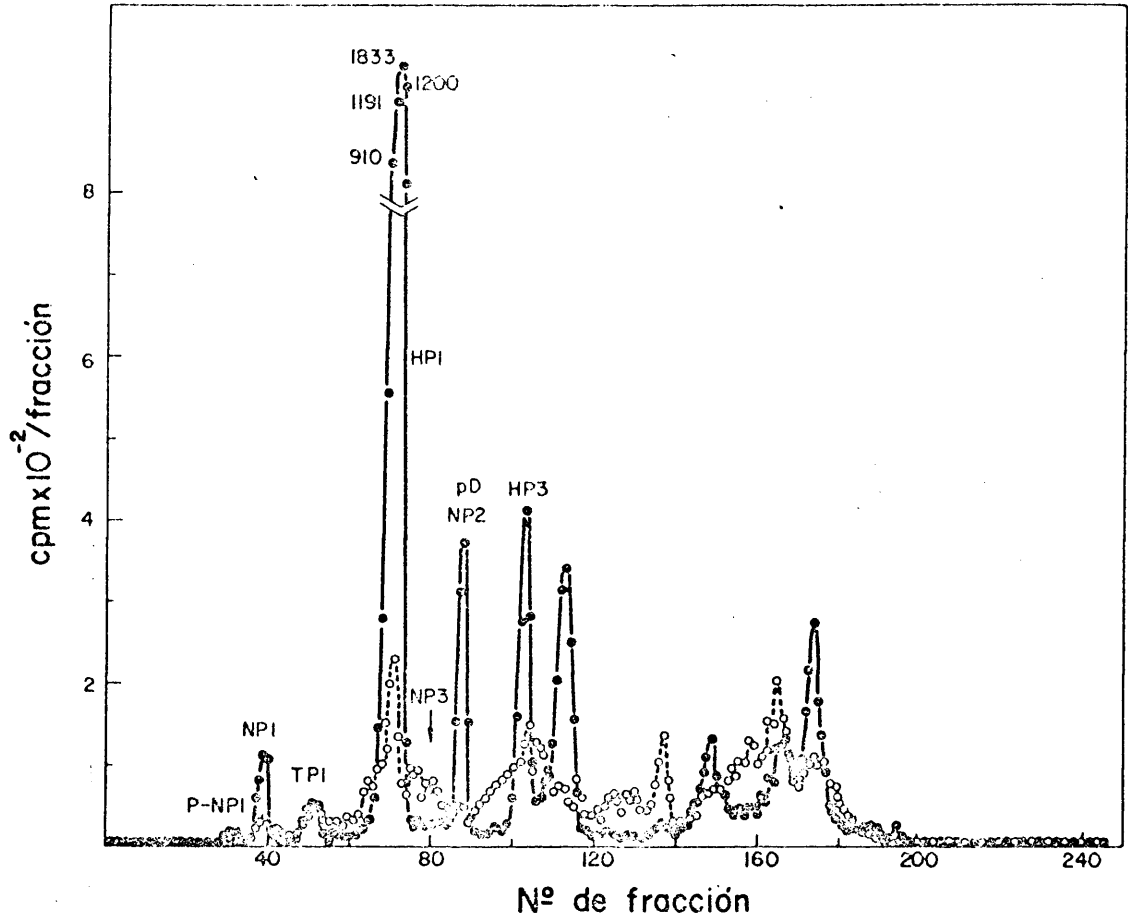


Figura 54. - Coelectroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* 110NA infectado con el mutante sus H542 y de las proteínas marcadas en bacterias sin infectar. -

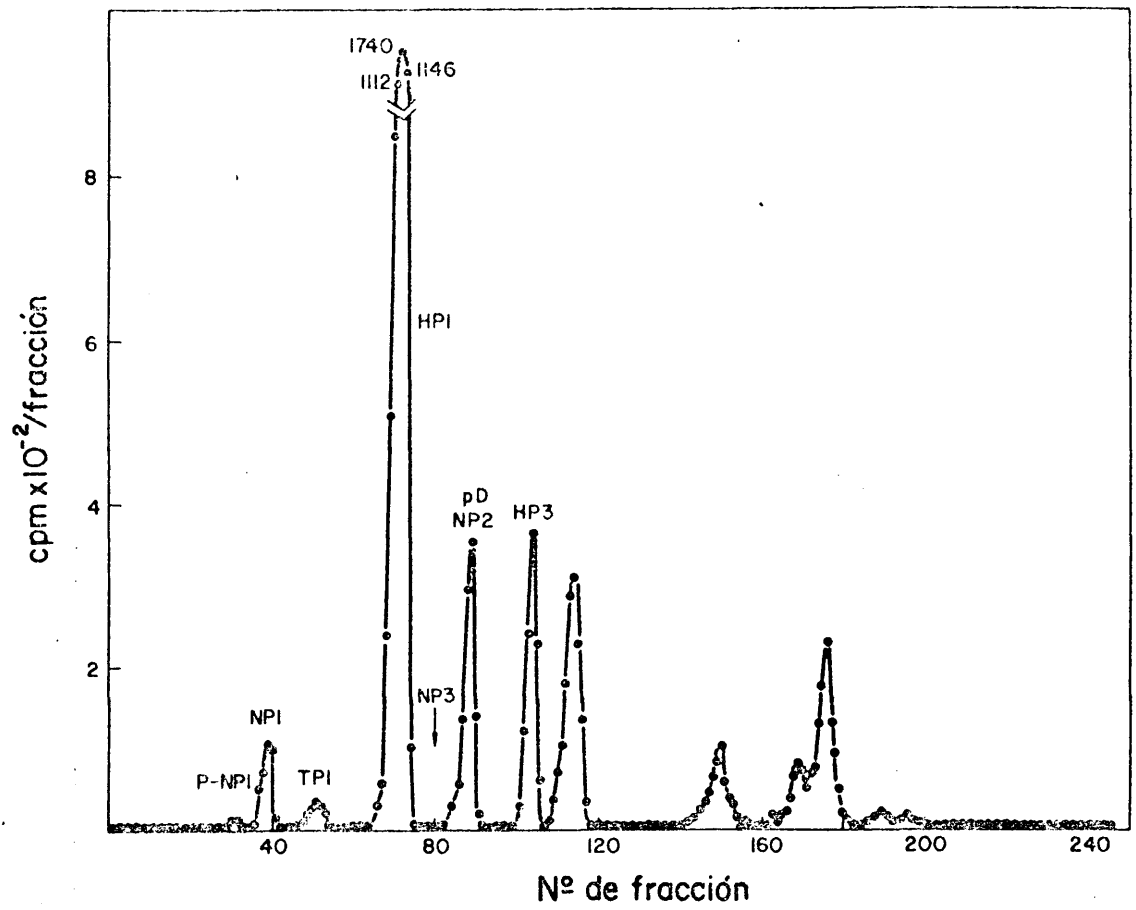


Figura 55.- Radioactividad específica del mutante sus H542 en geles de gradiente de acrilamida.-

M1241r3, N212, D241r3 y P112 marcadas con un pulso de aminoácidos- $C^{14}$  de 5 a 13 minutos después de la infección.

El mutante 144 no induce la síntesis de la proteína temprana de menor peso molecular presente en el control de proteínas inducidas por  $\phi 29$  normal (pI). Además, no tiene proteína pP de movilidad normal, y en su lugar aparece una proteína con movilidad ligeramente menor.

El mutante L53 tiene todas las proteínas presentes en el control infectado con fago normal. Sin embargo, otro mutante del mismo cistrón, el sus L55r3, que está localizado a la derecha del anterior en el mapa genético de  $\phi 29$ , no tiene proteína pP normal, y en su lugar aparece una proteína de movilidad electroforética ligeramente mayor.

El mutante M1241r3 sintetiza las mismas proteínas que el control sin infectar excepto que no tiene ni proteína pP ni proteína pQ normales. En su lugar tiene dos pro-



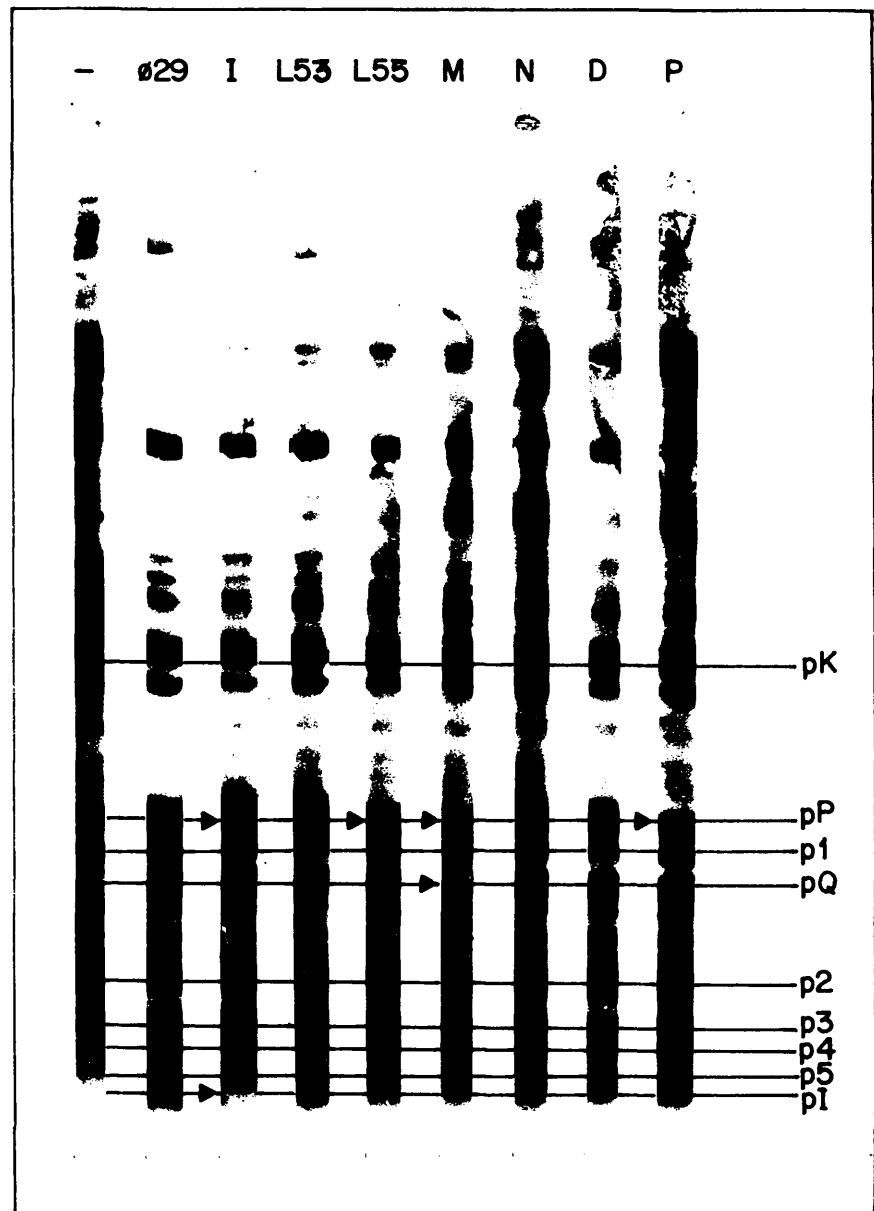


Figura 56.- Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus I44r3, sus L53, sus L55r3, sus M1241r3, sus N212, sus D241r3 y sus P112 marcadas en un pulso temprano.-

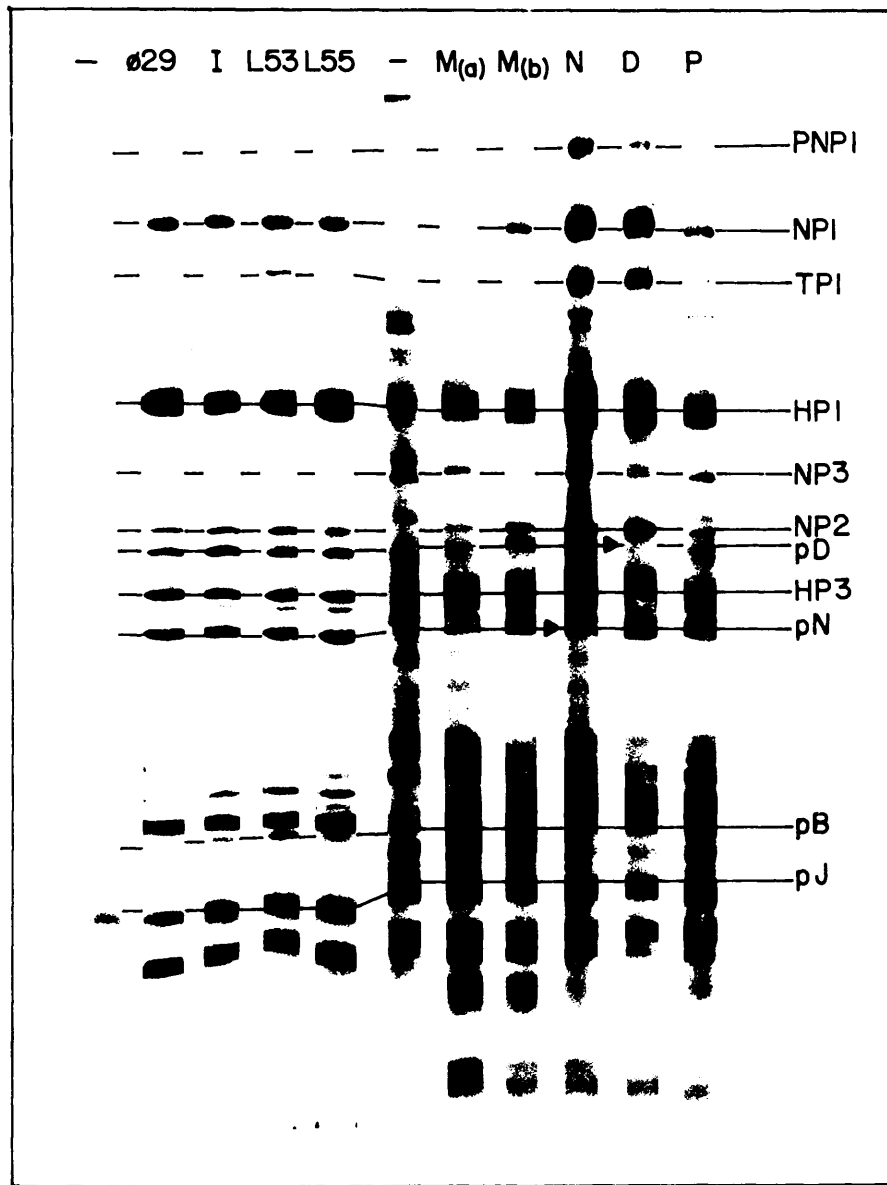


Figura 57. Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus I44r3, sus L53, sus L55r3, sus M1241r3, sus N212, sus D241r3 y sus P112 marcadas en un pulso tardío. -

teinas de movilidad en geles de poliacrilamida ligeramente mayor que las proteínas citadas. El mutante N212 induce la síntesis de las mismas proteínas tempranas que el control infectado con  $\phi$ 29 normal, así como el mutante D241. El mutante P112 no induce la síntesis de una proteína temprana mayoritaria entre las inducidas por fago normal (pP).

La figura 57 muestra la autorradiografía de las proteínas marcadas en un pulso de 20 a 28 minutos sintetizadas por los mutantes I44, L53, L55r3, M1241r3, N212, D241r3 y P112, y un pulso adicional desde los 35 a 43 minutos después de la infección con el mutante M1241r3. Las proteínas tardías inducidas por  $\phi$ 29 normal están presentes en los mutantes I44, L53, L55r3, M1241 y P112. El lento desarrollo del mutante M1241 (figura 40), puede ser debido a la síntesis retrasada de las proteínas tardías inducidas por el mutante, ya que solo en el pulso de 35 a 43 minutos después de la infección aparecen proteínas estructurales en cantidad apreciable.

El mutante N212 no induce la síntesis de la proteína tardía no estructural pN, que aparece en bacterias infec-

tadas con  $\phi 29$  normal con una movilidad electroforética algo mayor que la proteína estructural HP3.

El mutante D241r3 no induce la síntesis de una proteína no estructural que está presente en los pulsos tardíos en bacterias infectadas con fago normal (pD). Esta proteína tiene una movilidad electroforética en estos geles ligeramente mayor que la proteína estructural NP2.

j) Análisis de las proteínas sintetizadas por los mutantes ts I810 y ts J116 en condiciones permisivas y restrictivas. -

Para estudiar el efecto de la mutación de las proteínas determinadas por los genes I y J en la producción de las proteínas pP y HP3 con movilidad electroforética anormal, se realizaron experimentos de marcaje de las proteínas inducidas por mutantes sensibles a temperatura en estos cistrones en B. subtilis 110NA a 30°C (temperatura permisiva) y 42°C (temperatura

restrictiva).

La figura 58 muestra el desarrollo de los mutantes tsI810 y ts J116 al infectar a B. subtilis 110NA irradiado e incubado a 30° y 42°. Un control de bacterias infectadas con  $\phi$ 29 normal se incubó a 42°C como control positivo de desarrollo del fago. Como puede verse, los mutantes sensibles a temperatura cuando infectan B. subtilis a temperatura restrictiva no se desarrollan. Los mutantes a 30° se desarrollan más lentamente que el fago normal a 42°C, pero dan un título final incluso mayor que el obtenido en la infección con  $\phi$ 29 normal. Las proteínas inducidas por los mutantes ts I810 y ts J116, tanto a temperatura permisiva como restrictiva, se marcaron con leucina-C<sup>14</sup> como se describe en Métodos g, 5, así como los controles de bacterias irradiadas sin infectar y bacterias infectadas con fago normal.

La figura 59 muestra la autorradiografía de las proteínas marcadas a 30°C y 42°C por infección con el mutante ts I810, analizadas por electroforesis en placa de

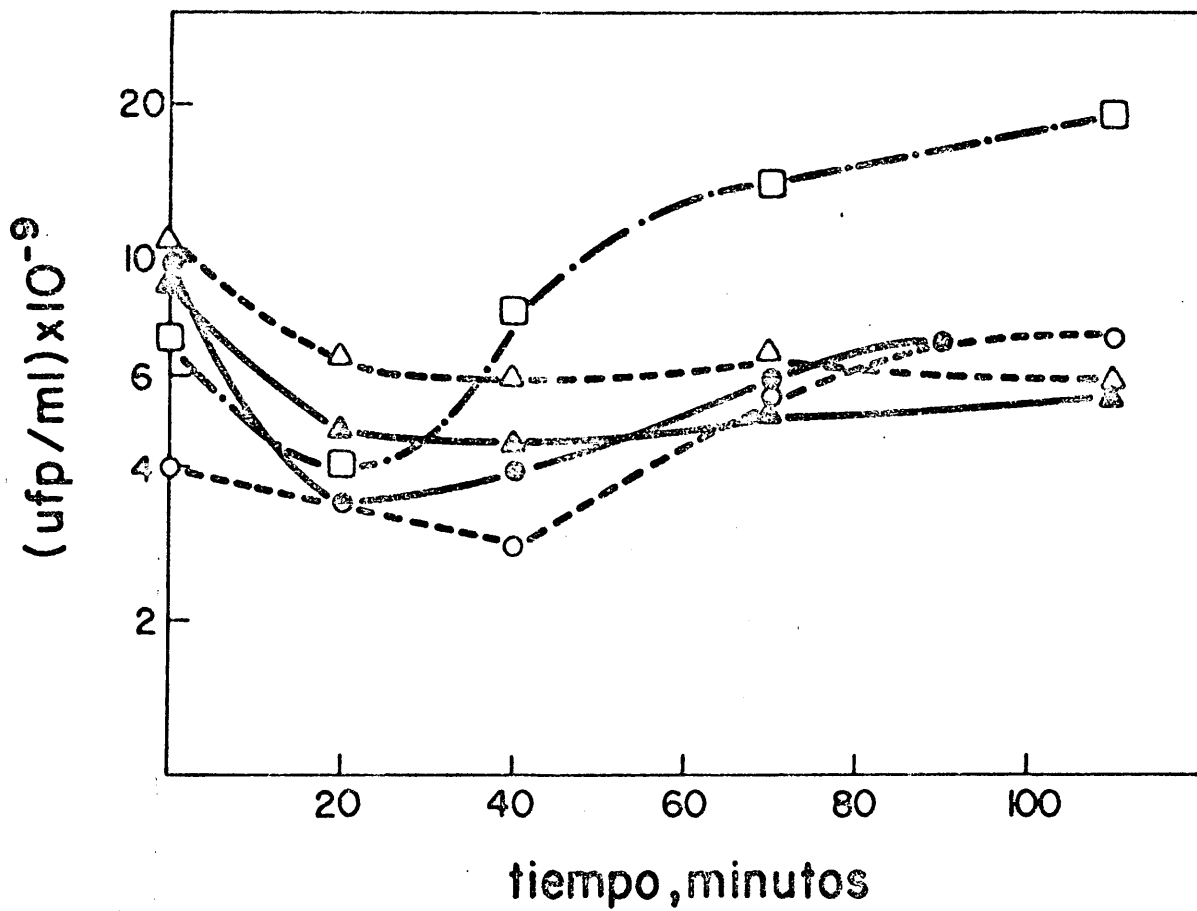


Figura 58. - Desarrollo de los mutantes tsI810 y ts J116 en B. subtilis 110NA a 30° y 42°C. -

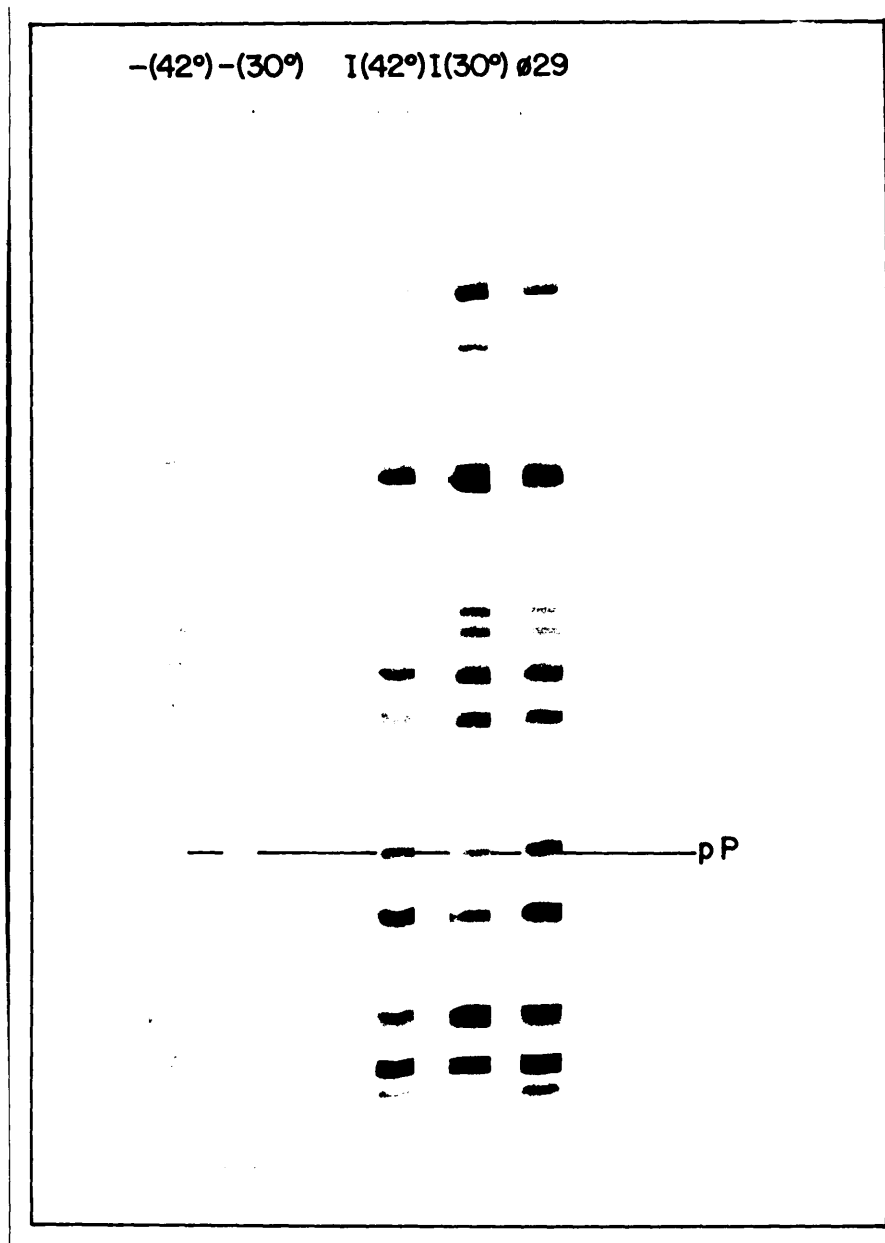


Figura 59. -Autorradiografía de las proteínas inducidas por el mutante ts I810 en condiciones permisivas y restrictivas. -

gel de poliacrilamida (Métodos m, 3). Como controles se muestran un pulso equivalente de bacterias infectadas con  $\phi 29$  normal, y las proteínas marcadas de las bacterias sin infectar, tanto a 30°C como a 42°C. La movilidad de la proteína pP, al contrario de como sucedía en el caso del mutante sus I44, es idéntica tanto a 30°C como a 42°C e igualmente idéntica a la del control infectado con fago normal.

La figura 60 presenta la autorradiografía de las proteínas inducidas por el mutante ts J116 a 30°C (temperatura permisiva) y a 42°C (temperatura restrictiva), analizadas por electroforesis en geles con un gradiente de acrilamida (Métodos m, 3).

Tanto en condiciones permisivas como en condiciones restrictivas, el mutante ts J116 induce la síntesis de proteína HP3 con la misma movilidad que la proteína HP3 inducida por  $\phi 29$  normal, al contrario de lo que ocurría con el mutante sus J614 que inducía una proteína HP3 con movilidad ligeramente mayor que la proteína inducida por  $\phi 29$  normal.



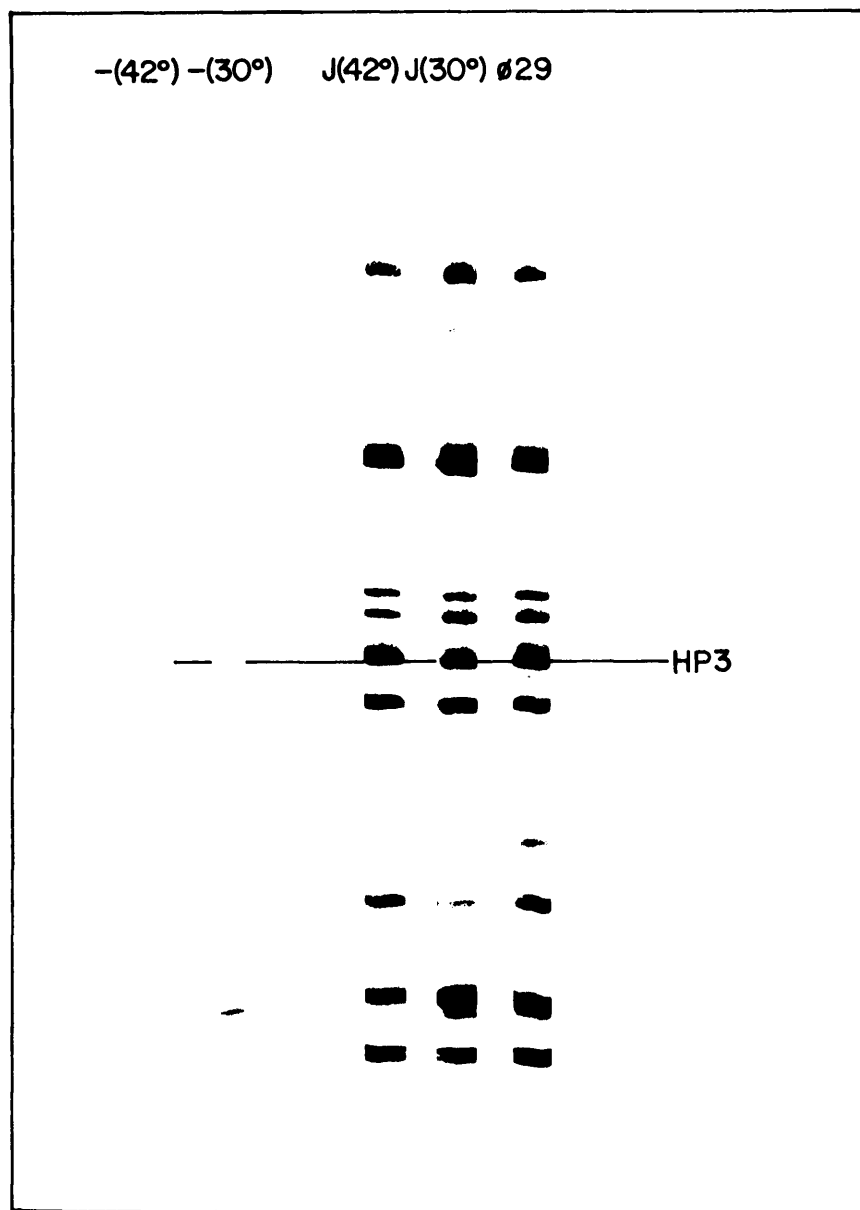


Figura 60. - Autorradiografía de las proteínas inducidas por el mutante ts J116 en condiciones permisivas y restrictivas. -

V. DISCUSSION

Utilizando B. subtilis irradiado con luz ultravioleta antes de infectar con el fago  $\phi 29$  para inhibir la síntesis de proteínas de la bacteria huésped se ha detectado la inducción de 12 proteínas no estructurales, además de las 7 proteínas estructurales presentes en la partícula del fago (22).

Las proteínas inducidas después de la infección con el fago  $\phi 29$  se pueden clasificar en dos grupos principales: aquellas que aparecen inmediatamente después de la infección (tempranas), y otras cuya síntesis ocurre a tiempos posteriores (tardías).

Entre las proteínas tempranas existen dos tipos: aquellas cuya síntesis decrece considerablemente a tiempos tardíos (III ó pP, XI ó P5 y XII ó pI) y el resto cuya síntesis se mantiene esencialmente constante durante todo el periodo del desarrollo del fago.

En el grupo de proteínas tardías se incluyen todas las proteínas estructurales de la partícula viral (HP1, HP2, HP3, NP1, NP2, NP3 y TP1) y otras tres proteínas no

estructurales (pD, pN y pJ), cuya síntesis presenta una cinética muy parecida a la de las proteínas estructurales.

La existencia de proteínas tempranas y tardías implica un control temporal de la síntesis de las proteínas inducidas por  $\phi 29$ . Cuando se infecta B. subtilis 110NA con el mutante sus O56, no se induce la síntesis de ninguna de las proteínas tardías. Este resultado indica que la proteína determinada por este gen juega un papel importante en la regulación de la aparición de las proteínas tardías inducidas por  $\phi 29$ . Este control podría realizarse a nivel de regulación de la producción de RNA mensajero o bien en el paso posterior de traducción del mensajero en proteínas.

Los datos obtenidos después de la infección de B. subtilis con  $\phi 29$ , indican que se ejerce un control, al menos en la producción de RNA mensajero. Los resultados de Hermoso (37), de Schachtele y cols (38, 39) y de Loskutoff y cols (40, 41) muestran la existencia de dos clases de RNA específico de  $\phi 29$ . El RNA temprano se transcribe de la banda L del DNA, y entre el RNA que se sintetiza a tiempos más tardíos en el periodo de desarrollo del fago, existen especies de las caracterizadas como tempranas, y otras exclusivas

del periodo tardío. Experimentos de hibridación y competencia del RNA específico de  $\phi 29$  con la banda L del DNA mostraron que el RNA temprano de  $\phi 29$  compete con todas las especies presentes en el RNA tardío que hibridizan con la banda L del DNA, mientras que no es capaz de competir con el RNA tardío que hibridiza con la banda H del DNA. Este resultado indica que las especies de RNA temprano sintetizadas tanto a tiempos tempranos como tardíos son transcritas de la banda L del DNA exclusivamente, mientras que las especies de RNA tardío se transcriben de la banda H(39).

En este aspecto, la transcripción del fago  $\phi 29$  se parece a la del fago T4, ya que en éste los genes tempranos se transcriben preferentemente de una banda del DNA (banda l), y los genes tardíos de la otra (banda r) (102). En ambos casos se requieren probablemente lugares distintos para la iniciación de la transcripción de los dos tipos de RNA.

Entre las especies de RNA temprano determinadas por el DNA de  $\phi 29$ , hay unas que se sintetizan tanto a tiempos

tempranos como tardíos (especies de peso molecular 370.000, 250.000, 90.000 y 40.000), y otra especie de RNA que solo se sintetiza a tiempos tempranos (de peso molecular 750.000) (38, 41). La desaparición de la síntesis de las proteínas pP, p5 y PI a tiempos tardíos podría ser compatible con la posibilidad de que estas proteínas fuesen especificadas por la especie de RNA de peso molecular 750.000 que solo se sintetiza inmediatamente después de la infección de la bacteria con  $\phi 29$ . Sin embargo el hecho de que los genes que determinan la síntesis de las proteínas pP y pI estén separados en el mapa genético por una región de genes tardíos (ver figura 59) descarta esta posibilidad e implica la existencia de un control en la síntesis de estas proteínas a nivel de traducción.

El total de las proteínas tempranas caracterizadas después de la infección por  $\phi 29$  representa un 21% de la información presente en su DNA, y las especies de RNA temprano inducidas dan cuenta de un valor muy próximo al 27% (40, 41).

Estos resultados, junto a los obtenidos en la síntesis in vitro de las proteínas y la asignación de las proteínas especificadas por los genes de  $\phi 29$ , (que se discutirán más adelante), indican que en el sistema de bacterias irradiadas e infectadas con  $\phi 29$ , se detectan la mayoría de las proteínas tempranas inducidas por el virus.

En conjunto, las proteínas no estructurales (tempranas y tardías) inducidas por el fago  $\phi 29$ , tienen un peso molecular total de 195.500 que dan cuenta del 35% del contenido de información del DNA de  $\phi 29$ . Otro 60% de la información del DNA se emplea para especificar la síntesis de las proteínas estructurales (22). Por lo tanto, las proteínas detectadas hasta la fecha dan cuenta de aproximadamente un 95% de la capacidad de información del DNA de  $\phi 29$ .

Como ya hemos comentado, el DNA de  $\phi 29$  se puede aislar en forma de círculos unidos no covalentemente por una proteína cuya movilidad electroforética en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico, es idéntica a

la de la proteína mayoritaria de la cápsida, con un peso molecular aproximado de 54.000 (15). El análisis de los péptidos trípticos de la proteína mayoritaria de la cápsida del fago (HP1) y de la proteína asociada al DNA (DAP) ha indicado que ambas proteínas están muy relacionadas estructuralmente, aunque presentan algunas diferencias (103). Una posibilidad es que ambas proteínas procedan de un mismo gen, que diese lugar a una preproteína que después se transformase por roturas específicas en las proteínas HP1 y DAP. Otra posibilidad es que sean determinadas por dos genes distintos, con lo que habría que aumentar en un 9% la información del DNA que se traduce en proteínas.

Como hemos indicado antes, las proteínas detectadas hasta la fecha, excluyendo la proteína asociada al DNA, dan cuenta de un 95% de la información del DNA de  $\phi 29$ . Teniendo en cuenta que la precisión en la determinación de los pesos moleculares de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS puede ser de  $\pm 10\%$ , sería posible



incluir en el DNA de  $\phi 29$  la capacidad para especificar la síntesis de la proteína asociada al DNA (si ésta no procede de un gen común con la proteína mayoritaria de la cápsida) o de alguna otra proteína no detectada hasta la fecha.

Es también muy probable que en el DNA de  $\phi 29$  existan señales, bien de control de transcripción o de traducción que no se traduzcan en proteínas, como se ha encontrado en otros casos. En el fago  $\lambda$ , se ha descrito la existencia de una región en un operón temprano, de 200 pares de nucleótidos que no se transcriben. Esta zona, parece estar situada entre el punto de unión de la RNA polimerasa al DNA, y el de la iniciación de la cadena de RNA (104). Por otra parte, en los colifagos  $Q\beta$  y R17, cuyo material genético es RNA, existen señales intercistricas no traducidas en proteínas (105). Si existen estas señales en el DNA de  $\phi 29$ , sería necesaria una información adicional. Recientemente Talavera ha determinado el peso molecular del DNA de  $\phi 29$  por microscopía electrónica utilizando como marcadores internos el DNA

del fago T7 y la forma relicativa del fago  $\phi$ X174 (106). El valor obtenido para el peso molecular del DNA de  $\phi$ 29 ha sido de  $12 \times 10^6$ . Este valor es superior en cerca de un 10% a los obtenidos previamente (15). La información adicional que teóricamente puede almacenar el DNA de  $\phi$ 29 con este valor de peso molecular, podría ser suficiente para dar cuenta de la síntesis de la proteína asociada al DNA si ésta no procede de un gen común con la proteína HP1, así como de la existencia de alguna otra proteína no detectada aún y de señales intercistricas no traducidas en proteínas.

Los experimentos de pulso y caza realizados en B. subtilis irradiado e infectado con  $\phi$ 29 sugerían una relación precursor-producto entre las proteínas P-NP1 y NP1. Esta relación se confirmó por la gran semejanza de los péptidos trípticos obtenidos de ambas proteínas, que implican una estrecha identidad estructural.

Por otra parte, cuando se infecta B. subtilis con mutantes sensibles a temperatura en cistrón B (que especifica la síntesis del precursor de la proteína NP1) en condiciones restrictivas de temperatura, se produce acumulación de la proteína P-NP1, mientras que en bacterias infectadas en condiciones permisivas para el fago mutante, no se produce esta acumulación de precursor, y aparece la proteína NP1 en cantidades normales. Estos resultados indican una clara relación entre ambas proteínas.

Utilizando geles de gradiente de poliacrilamida, ha sido posible detectar un polipéptido en la zona de peso molecular 10.000, que no está presente entre las proteínas inducidas por mutantes en el cistrón B. Es posible que este polipéptido sea el fragmento que se produce en la transformación de proteína P-NP1 (peso molecular 90.000) a NP1 (peso molecular 80.000).

La existencia de un precursor (P-NP1) de la proteína que forma los apéndices del cuello de la partí-

cula viral sugiere que, a semejanza con otros casos similares en fagos como T4 (46-50), lambda (12, 51, 52), P2 (53) y T5 (54), esta proteína puede estar implicada en algún paso en la maduración del virus.

Para estudiar el momento de transformación de la proteína P-NP1 en proteína NP1, se analizaron las proteínas inducidas por mutantes en los cistrones J y G que no son capaces de ensamblar ningún tipo de partícula. La transformación normal del precursor a producto en estos mutantes indica que ésta puede realizarse antes del ensamblamiento del precursor en la partícula.

Teniendo en cuenta la posición de los apéndices del cuello en la partícula viral sería posible que la transformación del precursor (P-NP1) en proteína NP1 estuviese implicada en el proceso de la encapsulación del DNA, ya que el cuello puede ser el "tapón" de la cápsida y por tanto determinar de alguna manera

la cantidad de DNA encapsulado.

Otra posibilidad es que los apéndices del cuello tengan una actividad litica que actúe bien en el proceso de inyección del DNA ó en el de rotura final de la bacteria. El bacteriofago nº 11 de Klebsiella induce la síntesis de una actividad polisacárido de polimerasa que está presente en los apéndices de las partículas del fago (107). Estos apéndices son muy similares a los apéndices del cuello de  $\phi 29$ .

Actualmente se está estudiando la posible inducción de una actividad similar después de la infección con  $\phi 29$  y, si se detecta dicha actividad, su posible relación con la proteína P-NP1 y /o NP1.

Los experimentos realizados de pulso y caza no han indicado la existencia de otros precursores de proteínas inducidas por  $\phi 29$ , estructurales o no estructurales.

En el sistema de síntesis de proteínas in vitro de E. coli dirigido por el DNA de  $\phi 29$ , se sintetiza RNA que es desplazado de un híbrido con el DNA de  $\phi 29$  en más de un 80% por el RNA sintetizado in vivo en presencia de cloramfenicol (RNA temprano). El porcentaje de competencia no aumenta cuando se añade RNA tardío como competidor, que contiene todas las especies de RNA inducidas por el fago (67). Estos resultados indican que el RNA sintetizado in vitro es esencialmente temprano.

El análisis de las proteínas sintetizadas in vitro con DNA lineal de  $\phi 29$  muestra que se sintetizan la mayoría de las proteínas inducidas in vivo a tiempos tempranos, menos una proteína minoritaria (pK).

La ausencia de síntesis de proteínas tardías, de acuerdo con el hecho de que no se sintetiza RNA mensajero tardío, puede deberse a que en nuestras condiciones de ensayo la RNA polimerasa de E. coli no es

capaz de reconocer los promotores del DNA de  $\phi 29$  que darían lugar a la síntesis de RNA mensajeros tardíos.

Se ha descrito que un aumento en la concentración de  $Mg^{++}$  da lugar a la iniciación de la síntesis de RNA en ciertos promotores que a una menor concentración de  $Mg^{++}$  no son transcritos (63).

Para estudiar esta posibilidad hemos realizado experimentos con distintas concentraciones de  $Mg^{++}$  sin que se apreciase la síntesis de ninguna proteína tardía. Solo se observaron cambios en las proporciones relativas de las proteínas tempranas sintetizadas.

Es posible que para la transcripción de los genes tardíos del DNA de  $\phi 29$  se requiera la presencia de una proteína específica que interaccione, bien con la propia RNA polimerasa, o bien directamente con el

DNA, dando lugar al reconocimiento y lectura de los promotores de las proteínas tardías del DNA. Si se tratase de una proteína que interaccionase con la propia RNA polimerasa es posible que fuese incapaz de hacerlo con la RNA polimerasa de E.coli, por lo que sería conveniente eliminar del sistema in vitro esta polimerasa y añadir en su lugar la de B.subtilis. La eliminación de la RNA polimerasa se puede conseguir pasando la fracción proteica sobrenadante del sistema de E.coli por columnas de DNA-celulosa, que retienen la RNA polimerasa, dejando pasar el resto de los enzimas implicados en el proceso de síntesis de proteínas (43). Añadiendo después la RNA polimerasa purificada de B.subtilis es posible estudiar la síntesis de proteínas tardías añadiendo diversas fracciones procedentes de células infectadas con  $\phi 29$ .

Otro posible camino de estudio del control de la transcripción de los genes tardíos de  $\phi 29$  in vitro, puede ser utilizar un sistema de síntesis de proteínas in vitro de B.subtilis similar al descrito recientemente



por Legault-Demare y col. (108).

Otra posibilidad es que el mecanismo que controla la producción de RNA mensajero tardío sea la conformación del DNA. Es decir, que a partir del DNA lineal solo se produzcan RNAs mensajeros tempranos, y que para la transcripción de genes tardíos se requiera la presencia de DNA circular.

La transcripción del DNA del virus SV40 depende de la conformación del mismo. Cuando está en forma circular y superenrollado se transcribe in vitro el genoma completo dando lugar a productos asimétricos de transcripción. Cuando se produce un corte en una de las bandas y el DNA se desenrolla, se transcriben las dos bandas dando productos simétricos de transcripción y de tamaño heterogéneo (109).

También la transcripción del DNA del fago lambda depende del grado de superhelicidad del mismo (110).

La principal dificultad para estudiar esta posibilidad en el caso del DNA de  $\phi 29$  es que el método de obtención de DNA circular puesto a punto hasta la fecha no permite obtener la cantidad requerida para los ensayos de síntesis de proteínas in vitro. Actualmente se está tratando de resolver este problema.

De cualquier manera, el sistema de síntesis de proteínas in vitro ofrece una serie de posibilidades para el estudio del control de la transcripción de los genes tardíos del DNA de  $\phi 29$ . También mediante el empleo de RNA mensajero aislado de bacterias infectadas por  $\phi 29$  se podrá estudiar la existencia de algún posible control a nivel de traducción.

Entre las actividades enzimáticas inducidas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , se encuentra una actividad de tipo lisozima (37). Como  $\phi 29$  es un fago lítico para B. subtilis, podría pensarse que la lisozima es el enzima

encargado de la lisis de la bacteria al igual que en otros casos, como T2 (111), lambda (112) y T4 (113).

Sin embargo existe evidencia que sugiere que la lisozima detectada después de la infección por  $\phi 29$  no es la actividad que da lugar a la lisis de las bacterias. En el sistema de síntesis in vitro dirigido por el DNA de  $\phi 29$  hemos detectado la síntesis de una actividad tipo lisozima, dependiente del DNA de  $\phi 29$ . Como en este sistema solo se sintetizan proteínas tempranas, estos resultados sugieren que si la actividad tipo lisozima detectada en el sistema in vitro, es la misma actividad que la inducida in vivo, ésta es una proteína temprana, lo que hace poco probable que se trate de una actividad lítica que, probablemente sería una proteína tardía.

Una posibilidad es que la actividad tipo lisozima de  $\phi 29$  sea similar a la descrita en el fago T7 (114), en el que este enzima se sintetiza a tiempos tempranos y está determinada por un gen que se encuentra

entre el grupo de genes implicados en la síntesis del DNA. Se ha especulado que esta actividad temprana tipo lisozima de T7, sea responsable de la liberación del complejo DNA-membrana que se requiere para iniciar la replicación del DNA (115).

Puede ocurrir sin embargo, en  $\phi 29$ , que como en el caso de T4 (63), el gen que especifique la lisozima sea adyacente a los genes tempranos y se pueda leer bajo el control de un operador temprano en determinadas condiciones. Aunque entre las proteínas sintetizadas in vitro por el DNA de  $\phi 29$  no se detectan por electroforesis proteínas tardías, si el ensayo de actividad enzimática fuera más sensible que la detección de proteínas radioactivas, quedaría explicada la existencia de la actividad tipo lisozima sintetizada en el sistema in vitro por extensión y lectura errónea del sistema de transcripción en las condiciones del sistema acelular de síntesis de proteínas empleado.

Los mutantes sensibles a supresor se han utilizado para establecer una correlación entre los genes del DNA y las proteínas por ellos especificadas, en distintos fagos. La existencia de señales de terminación anormales en el RNA mensajero de un mutante, provoca la interrupción de la traducción del mensaje genético, y por tanto se produce una proteína incompleta cuya longitud está en función de la posición de la mutación en el cistron.

Utilizando los mutantes sensibles a supresor obtenidos en nuestro laboratorio (28) y los de la colección de Reilly y cols (26), hemos determinado las proteínas especificadas por 13 genes de  $\phi 29$ . Mutantes en el gen R no producen las proteínas p4 y p5 tempranas, de bajo peso molecular. La incapacidad de este mutante de inducir la síntesis de estas dos proteínas puede ser debido a un efecto polar similar a los descritos en el fago lambda (12). Los genes K y Q determinan la síntesis de las proteínas tempranas pK y pQ.

Mutantes en el gen O no producen ninguna proteína tardía, lo que indica que la proteína especificada por este gen está implicada directa o indirectamente, en el control de las proteínas tardías de  $\phi 29$ , si bien no hemos detectado cual es la proteína producto del gen mutado en nuestro sistema. La detección y purificación de esta proteína puede servir para establecer un modelo de regulación de síntesis de proteínas inducidas por virus.

Los mutantes en el gen J no inducen en condiciones restrictivas la síntesis de la proteína tardía pJ.

La proteína estructural TP1 está determinada por el gen A, y el gen B especifica la proteína precursora P-NP1 que se transforma en la proteína de los apéndices del cuello del fago (NP1), produciendo además un fragmento en la transformación (pB).

Mutantes en el gen G no inducen en condiciones restrictivas para su desarrollo ni proteína HP1 (mayoritaria de la cápsida) ni HP3 (fibras). Estos resultados pueden

sugerir que ambas proteínas están especificadas por el mismo gen como en el caso de las proteínas A<sub>1</sub> y C del fago Q $\beta$  (116), o bien que se trate de un efecto polar del gen G sobre otro gen adyacente a él aun no determinado en Ø29.

Mutantes en el gen E no producen en condiciones restrictivas las proteínas estructurales NP2 y NP3, mientras que los mutantes en el gen H no producen en estas condiciones proteína NP3. Estos resultados sugieren la existencia de un efecto polar del gen E sobre el gen H, efecto que genéticamente se ha comprobado (28).

Los bajos valores de complementación obtenidos con mutantes sus en el cistrón E y mutantes ts en el cistrón H, y los altos valores obtenidos con mutantes sus en el cistrón H complementados con mutantes ts en el cistrón E, ó cuando se complementan mutantes ts en los cistrones E y H, sugieren que los cistrones E y H se transcriben de izquierda a derecha (sobre el mapa genético) en un mensajero policistrónico, dando lugar a un efecto

polar cuando la mutación sus está localizada en el cistrón E y no cuando la mutación se presenta en el cistrón H (que está a la derecha del cistrón E).

El gen I especifica la proteína pI que es temprana y es la proteína de menor peso molecular de todas las detectadas inducidas por Ø29.

El gen N especifica la proteína pN que es una proteína tardía no estructural de movilidad relativa algo mayor que la proteína estructural de las fibras del fago (HP3). Esta proteína pN parece ser dispensable en determinadas condiciones, ya que la infección en condiciones restrictivas con mutantes en el gen N produce un desarrollo de fago más lento, pero de igual orden de magnitud, que la infección con fago normal.

El gen D especifica la proteína pD que es también proteína tardía no estructural de movilidad parecida en geles de acrilamida de pH discontinuo a la proteína NP2 que forma el collar superior del cuello del fago.



Mutantes en el gen P no inducen en condiciones restrictivas la proteína pP, que es una proteína temprana mayoritaria.

La infección de B. subtilis 110 NA ( $su^-$ ) con un mutante sus en el gen J además de no inducir la proteína pJ, produce una proteína HP3 (fibras) de movilidad algo mayor en geles de pliacrilamida que la proteína inducida por  $\phi 29$  normal. También la infección en condiciones restrictivas para el desarrollo de un mutante sus en el gen I, induce la formación de una proteína pP de movilidad electroforética distinta a la inducida por  $\phi 29$  normal. Sin embargo, cuando se utilizan mutantes sensibles a temperatura en estos cistrones, y se analizan las proteínas inducidas por ellos en condiciones restrictivas de temperatura, aparecen las proteínas HP3 y pP en ambos mutantes idénticas a las inducidas por  $\phi 29$  normal (tanto a temperatura permisiva como a temperatura restrictiva). Como los mutantes sensibles a temperatura son capaces de sintetizar la proteína completa mutante aunque esta proteína no sea funcional a  $42^\circ$ , estos resultados pueden

sugerir que la aparición de las proteínas pP y HP3 modificadas entre las proteínas inducidas por mutantes sus en los cistrones I y J respectivamente, no se deba a la falta de funcionalidad de las proteínas especificadas por estos genes (ya que con mutantes sensibles a temperatura no aparecen modificadas), sino a que en los mutantes sensibles a supresor no se produce la proteína completa especificada por el gen mutado.

Un efecto similar parece existir en los mutantes del gen L. El mutante L55 produce una proteína pP modificada mientras que el mutante L53 produce proteína pP normal. No hemos podido identificar la proteína producto del gen L, pero como la longitud del fragmento producido por un mutante sus está relacionado con la posición de la mutación en el cistrón (71), es posible que el fragmento producido por el mutante L53 sea tan grande que impida la modificación de la proteína pP, mientras que el fragmento producido por el mutante L55 (que está a su derecha en el mapa genético y como se verá más adelante, en posición más amino-terminal), sea lo suficientemente corto como para permitir la modificación de la proteína pP.

El mutante sus M1241, en condiciones restrictivas, no es capaz de lisar la bacteria que infecta, y produce un rendimiento de fagos por bacteria similar o mayor al obtenido con fago normal, pero el desarrollo de este fago es mucho más lento. Estos resultados indican que la proteína especificada por el gen M es dispensable, pero no hemos podido detectar cual es la proteína determinada por este gen. Por otra parte, la infección con el mutante M1241 en condiciones restrictivas, induce la formación de las proteínas pP y pQ modificadas. Cuando dispongamos de mutantes sensibles a temperatura en este cistrón, será posible estudiar algo más sobre la forma en que la proteína especificada por el gen M está relacionada con la producción de las proteínas pP y pQ modificadas.

Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que la inducción por los mutantes sus I44, J614, L55 y M1241 de varias proteínas con movilidad electroforética alterada, se deba a que son múltiples mutantes que, además de tener alterado el gen correspondiente, lleven en su genoma otras alteraciones génicas que sean las responsables de la aparición de estas proteínas distintas de las inducidas por fago normal. El retrocruzamiento realizado con fago  $\phi$ 29 normal

de los mutantes I44, L55 y M1241, no asegura que los mutantes retrocruzados tengan una mutación simple, aunque es cierto que aumentan la posibilidad de que lo sea.

Para estudiar esta posibilidad, se deben conseguir más mutantes en los cistrones mencionados, y analizar las proteínas inducidas por ellos en condiciones restrictivas.

La figura 61 muestra el mapa genético de  $\phi 29$ , con los grupos de complementación ordenados por Moreno y col (29) y las proteínas especificadas por cada uno de los cistrones determinadas utilizando mutantes sensibles a supresor. Como se ve, existen 3 zonas del DNA de  $\phi 29$  que dan lugar a síntesis de proteínas tempranas, y dos zonas intercaladas con las anteriores que producen la síntesis de proteínas tardías. Además, las proteínas estructurales están especificadas por una serie de genes agrupados (desde el G al B). Ya hemos indicado que esta agrupación de genes que especifican proteínas de funciones relacionadas, se ha descrito en otros bacteriófagos como lambda(72, 73, 74), T4 (45, 50) y P22 (75). Cuando se conozcan más datos sobre las funciones de las proteínas in-

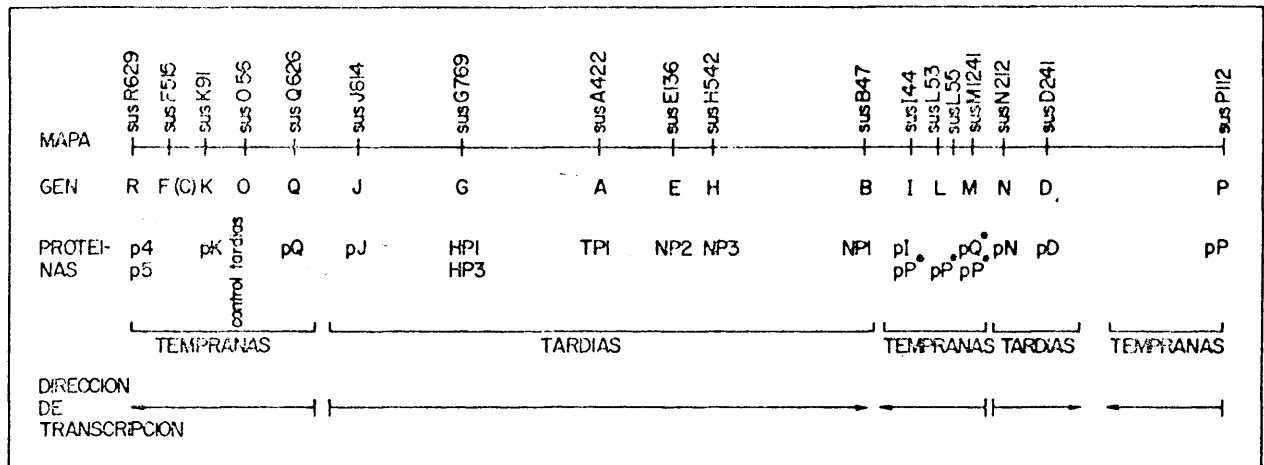


Figura 61.- Mapa genético lineal de  $\phi 29$ : Correlación gen-proteína y dirección de transcripción.-

ducidas por  $\phi 29$ , se podrán determinar si existen más agrupamientos de genes de este tipo. Los datos disponibles hasta ahora sugieren que la proteína especificada por el gen J (que es tardía), está implicada en el proceso de morfogénesis del fago (43). De acuerdo con esto, el gen J está al lado del grupo de genes que especifican las proteínas estructurales de  $\phi 29$ .

Las otras dos proteínas tardías no estructurales inducidas por el fago (pN y pD) podrían estar implicadas en procesos morfogenéticos y (o) de lisis de la bacteria. La proteína pN es dispensable en ciertas condiciones de crecimiento ya que mutantes en el gen N se desarrollan más lentamente, pero alcanzan un rendimiento final de fagos por bacteria del mismo orden que cuando se infecta la bacteria con  $\phi 29$  normal. Actualmente se están realizando estudios con mutantes letales condicionales en estos genes para esclarecer su posible función morfogenética.

Por otra parte, existen una serie de mutantes de  $\phi 29$  que no son capaces de sintetizar DNA. Estos mutantes han sido asignados a los grupos de complementación R, F, K, C, Q y P. En la figura 61 se muestra que todos estos cistro-

nes, excepto el P, están agrupados en la zona izquierda del mapa genético.

Es lógico suponer que también en este caso nos encontramos con otro agrupamiento de genes que determinan la síntesis de proteínas que van a ejercer una función relacionada.

Existe evidencia que sugiere la posibilidad de que las proteínas especificadas por los genes I, L y M actúen también en funciones relacionadas con la proteína pP, ya que mutantes sensibles a supresor en estos cistrones producen en condiciones restrictivas proteína pP de movilidad anormal en geles de poliacrilamida, aunque son necesarios estudios posteriores sobre la función de estas proteínas para decidir si estos genes forman otra agrupación similar a las ya mencionadas. Por otra parte, también será necesario descartar la existencia de dobles mutaciones en dichos mutantes, ya que podría ser esta la causa de la aparente relación entre estas proteínas.

Como ya hemos comentado en este apartado, la transcripción del DNA de  $\phi 29$  es asimétrica: el RNA temprano se transcribe de la banda L del DNA y el RNA tardío se transcribe de la banda H (39). Estos resultados implican que la transcripción temprana y la tardía del DNA de  $\phi 29$ , llevan sentidos opuestos ya que la transcripción del DNA se lleva a cabo desde el extremo 3'-OH al 5'-fosfato del mismo y las dos cadenas del DNA son antiparalelas.

Para definir el sentido de la transcripción de los genes tardíos del DNA de  $\phi 29$ , nos hemos basado en el efecto polar del gen E sobre el gen H. Ya hemos comentado que tanto a nivel genético (28) como en cuando al estudio de las proteínas especificadas por ambos cistrones parece que el mutante E ejerce un efecto polar sobre el gen H que está situado a su derecha en el mapa genético. Estos resultados indican que la transcripción de esa zona del DNA se lleva a cabo de tal manera que se produce un RNA mensajero policistrónico. Cuando se emplea un mutante sus en el gen E, el RNA mensajero formado en condiciones



restrictivas solo puede traducirse en una pequeña extensión de tal manera que no produce ninguna de las proteínas (NP2, NP3) especificadas por él. Sin embargo, cuando se emplea un mutante sus en el gen H ( que está a la derecha del gen E), sí se produce la proteína especificada por el gen E, aunque no la especificada por el gen H.

Estos resultados implican que la transcripción del DNA de  $\phi 29$  entre los genes E y H ( y por tanto para toda la banda H del DNA que se transcribe en proteínas tardías) es de izquierda a derecha sobre el mapa genético de  $\phi 29$  que se muestra en la figura 61.

El análisis de distintos mutantes sensibles a supresor del cistron B (26) han demostrado que mientras que ciertos mutantes no producen en condiciones restrictivas un fragmento de la proteína por él codificada (ya que desaparece al ser pequeño), otros situados a la derecha de los anteriores sobre el mapa genético (29) producen en condiciones restrictivas un

fragmento identificable como tal (99). Estos resultados confirman que la transcripción de los genes que dan lugar a RNA mensajeros tardíos, se lleva a cabo sobre el mapa genético de  $\phi 29$  de izquierda a derecha.

La transcripción de los genes tempranos de  $\phi 29$  se efectúa, como hemos dicho, de la banda L del DNA, y al ser ésta antiparalela con la banda H, la transcripción sobre el mapa genético de la figura 61 de los genes tempranos, debe realizarse de derecha a izquierda.

Independientemente de la existencia de agrupaciones genéticas relacionadas por su función en el DNA de  $\phi 29$ , la asignación de las proteínas especificadas por los cistrones determinados en el DNA de  $\phi 29$  nos ha permitido detectar la existencia de tres zonas del DNA que producen proteínas tempranas. La existencia de estas tres zonas supone que existen tres zonas del DNA físicamente separadas a las que es capaz de unirse la RNA polimerasa del huésped para iniciar la transcripción temprana (promotores tempranos).

Experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio han permitido detectar, por visualización por microscopía electrónica y estudio estadístico de los resultados por un programa de cooperatividad multiplicativo, que la RNA polimerasa de B. subtilis se une al DNA de  $\phi 29$  en 3 sitios distintos, localizados uno en el extremo derecho del DNA, otro aproximadamente a un cuarto de la longitud del DNA, y el otro a una distancia de tres cuartos de la longitud del DNA (77).

Estos puntos de unión son presumiblemente los promotores tempranos del DNA de  $\phi 29$ , y coinciden con los puntos del DNA que se podrían establecer como promotores tempranos, teniendo en cuenta las zonas determinadas como tempranas mediante la asignación gen-proteína establecida con los mutantes sensibles a supresor, y teniendo en cuenta la dirección de transcripción de los genes tempranos sobre el mapa genético de  $\phi 29$  establecida como ya hemos indicado en el párrafo anterior. Esta coincidencia de datos utilizando dos sistemas de detección independientes apoyan fuertemente los resultados obtenidos.

VI. CONCLUSIONES

1. - Utilizando B. subtilis irradiado con luz ultravioleta infectado con el bacteriófago  $\phi 29$  se ha detectado la inducción de 12 proteínas no estructurales, además de las 7 proteínas estructurales del fago, que se han separado por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico.
2. - Se ha determinado la existencia de un control temporal en la síntesis de proteínas inducidas por  $\phi 29$ ; éstas se pueden clasificar en dos grupos: tempranas (que aparecen inmediatamente después de la infección) y tardías.
3. - Se ha demostrado la existencia de un precursor de la proteína que forma los apéndices del cuello del fago  $\phi 29$ .
4. - Se ha puesto de manifiesto que la proteína especificada por el gen O está relacionada con el control de la aparición de las proteínas tardías inducidas por el fago  $\phi 29$ .
5. - Se ha obtenido la síntesis de la mayoría de las proteínas tempranas de  $\phi 29$ , en un sistema acelular de síntesis de proteínas de E. coli. Asimismo, se ha detectado la síntesis in vitro de una actividad enzimática tipo lisozima, similar a la inducida in vivo en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ .

- 6.- Mediante el empleo de mutantes sensibles a supresor, se han determinado las proteínas especificadas por 13 de los 18 genes de  $\phi 29$ .
- 7.- La determinación del efecto polar del gen E sobre el gen H, nos ha permitido establecer la dirección de transcripción de los genes del fago  $\phi 29$ .
- 8.- La correlación de las proteínas inducidas y el mapa genético, nos ha permitido detectar:
  - a) la existencia de tres zonas del DNA que dan lugar a síntesis de proteínas tempranas y dos zonas que dan lugar a proteínas tardías.
  - b) agrupamiento físico en el DNA del fago  $\phi 29$ , de genes que especifican proteínas relacionadas en su función (proteínas estructurales y proteínas relacionadas con la síntesis de DNA).

VII. LEYENDAS DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de fago  $\phi 29$  e incorporación de leucina radioactiva. -

B. amyloliquefaciens crecido en medio mínimo (Métodos a, 3), se infectó con fago  $\phi 29$  en presencia de  $0,5 \mu\text{C/ml}$  de leucina- $\text{C}^{14}$ . A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos c) (—●—), y determinar radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (- - -○- - -) (Métodos, p).

Figura 2. Gradiente de ClCs por capas de las partículas marcadas en B. amyloliquefaciens infectado con  $\phi 29$ . -

Un lisado de bacterias infectadas con  $\phi 29$  y marcadas con leucina- $\text{C}^{14}$  (Métodos f), se centrifugó a alta velocidad y el sedimento, resuspendido en D.F., se centrifugó en un gradiente de ClCs con 3 capas de densidades 1.1, 1.3 y 1.5. Se tomó una alícuota de cada fracción del gradiente para determinar la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos, p). En la figura se señala la posición del fago  $\phi 29$ .



Figura 3. Purificación de cabezas vacías de  $\phi 29$  por centrifugación en ClCs hasta equilibrio. -

Las fracciones del gradiente por capas de ClCs que contenían cabezas vacías de  $\phi 29$ , se sometieron a centrifugación en ClCs de densidad media 1,30 gr/ml. De cada fracción del gradiente se tomó una alícuota para determinar la radioactividad total (—•—). Alícuotas de las fracciones señaladas en la figura, se emplearon para determinar la densidad (- - o - -).

Figura 4. - Gradiente neutro de sacarosa del DNA de  $\phi 29$ . -

El DNA de  $\phi 29$  extraído como se describe en Métodos, j se analizó mediante un gradiente preformado de sacarosa entre el 5 y el 20% (peso/volumen) en un tampón Tris ClH 50mM pH7,8, EDTA 10mM y ClNa 1M. Se determinó la absorción a 260 nm en cada una de las fracciones del gradiente.

Figura 5. Gradiente alcalino de sacarosa del DNA de  $\phi 29$ .

El DNA de  $\phi 29$  extraído como se describe en Métodos, j, se analizó en un gradiente prefabricado de sacarosa entre el 5 y el 20% (peso volumen) en un tampón Tris-ClH 50 mM pH 7,8, EDTA 10 mM, ClNa 0,9M y NaOH 0,1M. Se determinó la absorción a 260 nm, en cada una de las fracciones del gradiente.

Figura 6. Incorporación de ácido  $\alpha, \epsilon$ -diaminopimélico- $H^3$  en E. coli.

E. coli C se creció en medio completo (Métodos a, 4) en presencia de  $10 \mu\text{C/ml}$  de ácido  $\alpha, \epsilon$ -diaminopimélico- $H^3$  ( $1 \text{ mC/ml}$ ,  $200 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ ), hasta que el cultivo alcanzó fase estacionaria. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas del cultivo y se determinó la radioactividad presente en material insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos, p).

Figura 7. Incorporación de leucina radioactiva y desarrollo de  $\phi 29$  en B. subtilis irradiado con luz ultravioleta.

B. subtilis 110 NA irradiado con luz ultravioleta, se infectó con  $\phi 29$  y se marcó con  $25 \mu\text{C/ml}$  de leucina- $\text{H}^3$  mediante pulsos a los tiempos indicados en la figura, como se describe en Métodos g, 2. Un control de bacterias irradiadas, se marcó de la misma manera con  $7,5 \mu\text{C/ml}$  de leucina- $\text{C}^{14}$ . La línea discontinua representa la leucina- $\text{C}^{14}$  incorporada en bacterias sin infectar. La línea continua representa la leucina- $\text{H}^3$  incorporada en bacterias infectadas.

El fago total, presente en el cultivo infectado se determinó tomando alícuotas a los tiempos indicados y lisando las bacterias con lisozima (—●—) (Métodos, c).

Figura 8. Incorporación de leucina radioactiva en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar.

Bacterias irradiadas, infectadas y sin infectar se marcaron uniformemente con leucina- $H^3$  ( $25 \mu C/ml$ ,  $0,01 mM$ ). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de los cultivos y se determinó la radioactividad incorporada en material insoluble en ácido tricloroacético al 5%.

(—●—): Radioactividad incorporada en bacterias infectadas con  $\phi 29$ .

(- - -○- - -): Radioactividad incorporada en bacterias sin infectar.

Figura 9. Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 0 a 3 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar.

Las bacterias irradiadas se marcaron mediante un pulso de leucina radioactiva, de 0 a 3 minutos después de la infección con  $\phi 29$ . Una mezcla de

bacterias infectadas y sin infectar, se lisaron y se prepararon para electroforesis como se describe en Métodos g, 2. La coelectroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de 15 cm. de longitud, que contenían acrilamida 12,5%, urea 8M y dodecil sulfato sódico 0,1% (Métodos m, 1). El ánodo se representa a la derecha de la figura.

(--o--): Radioactividad correspondiente a bacterias sin infectar.

(—●—): Radioactividad correspondiente a bacterias infectadas.

Figura 10. Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 5 a 8 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -

Las bacterias irradiadas infectadas y sin infectar se marcaron mediante un pulso de leucina radioactiva de 5 a 8 minutos después de la infección con  $\phi 29$ . Una mezcla de bacterias infectadas y sin infectar se lisaron y se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la figura 9.

(- - - o - - -): Radioactividad de bacterias sin infectar.

(- - - ● - - -): Radioactividad de bacterias infectadas

Figura 11. Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 10 a 13 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar.

Las bacterias irradiadas infectadas y sin infectar se marcaron mediante un pulso de leucina radioactiva de 10 a 13 minutos. Una mezcla de bacteria

infectadas y sin infectar se lisaron y se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la figura 9.

(- - -o- - -): Radioactividad de bacterias sin infectar.

(—●—): Radioactividad de bacterias infectadas.

Figura 12. - Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 15 a 18 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -

Las bacterias irradiadas infectadas y sin infectar se marcaron mediante un pulso de leucina radioactiva de 15 a 18 minutos. Una mezcla de bacterias infectadas y sin infectar se lisaron y se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la figura 9.

(- - -o- - -): Radioactividad de bacterias sin infectar.

(—●—): Radioactividad de bacterias infectadas.

Figura 13. - Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 20 a 23 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -

Las bacterias irradiadas infectadas y sin infectar se marcaron mediante un pulso de leucina radioactiva de 20 a 23 minutos. Una mezcla de bacterias infectadas y sin infectar se lisaron y se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la figura 9.

(- - - o - - -) Radioactividad de bacterias sin infectar  
 (—●—) Radioactividad de bacterias infectadas

Figura 14. - Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 25 a 28 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar. -

Las bacterias irradiadas infectadas y sin infectar se marcaron mediante un pulso de leucina radioactiva de 25 a 28 minutos. Una mezcla de bacterias infectadas y sin infectar se lisaron y se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la figura 9.

(- - - o - - -) Radioactividad de bacterias sin infectar  
 (—●—) Radioactividad de bacterias infectadas.



Figura 15. - Perfil electroforético de las proteínas marcadas radioactivamente mediante un pulso de 34 a 37 minutos en B. subtilis irradiado, infectado con  $\phi 29$  y sin infectar.

Las bacterias irradiadas infectadas y sin infectar se marcaron mediante un pulso de leucina radioactiva de 34 a 37 minutos. Una mezcla de bacterias infectadas y sin infectar se lisaron y se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la figura 9.

(- - - o - - -) Radioactividad de bacterias sin infectar  
 (—•—) Radioactividad de bacterias infectadas.

Figura 16. - Coelectroforesis de las proteínas estructurales del fago  $\phi 29$  y las proteínas inducidas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ .

B. subtilis 110NA irradiado e infectado con  $\phi 29$ , se marcó con leucina- $H^3$  en un pulso de 20 a 23 minutos después de la infección con  $\phi 29$ , se lisó y preparó para electroforesis como se describe en Métodos g, 2, mezclándose con fago  $\phi 29$  marcado con leucina- $C^{14}$  y purificado como se describe en Métodos, f. La coelectroforesis se llevó a cabo en geles de 10 cm. que contenían acrilamida al 10% y dodecil

sulfato sódico 0,1%, en un sistema de pH discontinuo. El ánodo se representa a la derecha de la figura.

- (- - - o - - -) Radioactividad de fago marcado con leucina- $C^{14}$ .
- (—●—) Radioactividad de bacterias infectadas con  $\phi 29$  marcadas con leucina  $H^3$ .

Figura 17. - Coelectroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis irradiado, infectado con el fago  $\phi 29$  y sin infectar. -

Las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA irradiado con luz ultravioleta, infectado con el fago  $\phi 29$ , y sin infectar se marcaron con leucina- $H^3$  y leucina- $C^{14}$  respectivamente, en un pulso de 20 a 23 minutos, se mezclaron, y se prepararon para electroforesis como se describe en Métodos g, 2. Las condiciones de electroforesis fueron las descritas en la figura 16.

- (- - - o - - -) Radioactividad de bacterias sin infectar.
- (—●—) Radioactividad de bacterias infectadas con  $\phi 29$ .

Figura 18. - Perfil electroforético de la radioactividad específica de fago. -

El cálculo de la radioactividad específica de fago presente en la electroforesis de la figura 17, se realizó siguiendo el método de Mayol y Sinsheimer (99), siendo las cuentas específicas del fago ( $H^3$ ) = total de cuentas  $H^3$  - cuentas  $C^{14}$  x Rmin; Rmin es la relación mínima de  $H^3/C^{14}$  en las fracciones del gel.

Figura 19. - Cinética de síntesis de las proteínas no estructurales inducidas en B. subtilis infectado con el fago  $\phi 29$ .

Se ha determinado calculando para cada proteína el porcentaje de su valor máximo de síntesis en una serie de pulsos dados a lo largo del desarrollo del fago (Métodos g, 2). Para calcular el valor de la radioactividad de cada proteína en los distintos pulsos, se determinó la radioactividad específica de fago por el método de Mayol y Sinsheimer (99).

Figura 20. - Cinética de síntesis de las proteínas estructurales inducidas en B. subtilis infectado con el fago  $\phi 29$ . -

El cálculo de la cinética de síntesis se ha realizado como se ha descrito en la figura 19.

Figura 21. - Coelectroforesis en sistema de pH continuo de las proteínas marcadas radioactivamente en un pulso de 22 a 24 min. después de la infección de B. subtilis con  $\phi 29$  frente a las proteínas marcadas radioactivamente en un pulso de 21 a 26 min. seguido de caza. -

B. subtilis 110NA irradiado con luz ultravioleta e infectado con  $\phi 29$  se marcó con leucina- $H^3$  en un pulso de 22 a 24 min. después de la infección, y con leucina- $C^{14}$  en un pulso de 21 a 26 min. seguido de 5 min. de caza (Métodos, g, 3). Las bacterias marcadas se mezclaron y se prepararon para electroforesis como se describe en Métodos g, 4. La electroforesis se llevó a cabo en geles de 15 cm. de longi

tud, en sistema de pH continuo (Métodos m,1), conteniendo acrilamida 12,5%, urea 8M y dodecil sulfato sódico 0,1%.

(- - - o - - -) Radioactividad de bacterias infectadas marcadas en pulso de 5 min. seguido de 5 min. de caza; (—●—) Radioactividad de bacterias infectadas marcadas en un pulso de 2 min.

Figura 22. - Coelectroforesis en sistema de pH discontinuo de las proteínas marcadas radioactivamente en un pulso de 22 a 24 min. después de la infección de B. subtilis con  $\phi 29$  frente a las proteínas marcadas radioactivamente en un pulso de 21 a 26 min. seguido de caza. -

Bacterias irradiadas e infectadas con  $\phi 29$  se marcaron en un pulso de 2 minutos con leucina- $H^3$  y en un pulso de 5 minutos seguido de 5 minutos de caza como se describe en la figura 21, y se prepararon para electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo en geles de 10 cm. con acrilamida 10%, y dodecil

sulfato sódico 0,1%, en un sistema de pH discontinuo (Métodos m, 2). (---o---) Radioactividad de bacterias infectadas marcadas en un pulso de 5 min. seguido de 5 min. de caza. (—\*—) Radioactividad de bacterias infectadas marcadas en un pulso de 2 minutos.

Figura 23. - Estimación del peso molecular de la proteína P-NP1. -

El peso molecular de la proteína p-NP1 se determinó en gel de poliacrilamida en un sistema de pH discontinuo (Métodos m, 2) en presencia de dodecil sulfato sódico 0,1% llevando como marcadores, las proteínas estructurales del fago HP3 (28.000), HP1 ( 54.000 ), TP1 ( 71.000 ), NP1 ( 80.000 ) y fosforilasa A (92.500 ). La flecha indica la movilidad electroforética de la proteína P-NP1.

Figura 24. - Coelectroforesis en sistema de pH continuo de las proteínas marcadas radioactivamente en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , marcadas mediante pulso de 2 min. y caza, frente a las proteínas marcadas en pulso de 5 min. y caza. -

B. subtilis 110 NA irradiado e infectado con  $\phi 29$  se marcó con leucina- $\text{II}^3$  en un pulso de 22 a 24 min. seguido de 5 min. de caza y con leucina  $\text{C}^{14}$  desde los 21 a los 26 min., seguido de 5 min. de caza (Métodos g, 3). Las bacterias marcadas se mezclaron y se prepararon para electroforesis como se describe en Métodos g, 4. La electroforesis se llevó a cabo en geles de 15 cm. de longitud con acrilamida 12,5%, urea 8M y dodecil sulfato sódico 0,1%.

(---○---) Radioactividad de las proteínas marcadas en un pulso de 5 min. seguido de caza.  
 (—●—) Radioactividad de las proteínas marcadas en pulso de 2 min. seguido de caza.

Figura 25. - Coelectroforesis en sistema de pH discontinuo de las proteínas marcadas radioactivamente en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , marcadas mediante pulso de 2 min. y caza, frente a las proteínas marcadas en pulso de 5 min. y caza. -

Bacterias irradiadas e infectadas con  $\phi 29$  se marcaron mediante un pulso de 2 minutos con leucina- $H^3$ , seguido de 5 min. de caza y en un pulso de 5 minutos con leucina- $C^{14}$ , seguido de 5 min. de caza, preparándose para electroforesis como se describe en Métodos g, 4. La electroforesis se llevó a cabo en geles de 10 cm. con acrilamida 10% y dodecil sulfato sódico 0,1% en un sistema de pH discontinuo (Métodos m, 2. (---o---) Radioactividad de las proteínas marcadas en un pulso de 5 min. seguido de caza. (—o—) Radioactividad de las proteínas marcadas en un pulso de 2 min. seguido de caza.



Figura 26. - Coelectroforesis en sistema de pH continuo de las proteínas marcadas en B. subtilis sin infectar en un pulso de 22 a 24 min. frente a las proteínas marcadas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , en un pulso de 21 a 26 min. seguido de caza. -

B. subtilis 110NA irradiado, se marcó con leucina- $H^3$  en un pulso de 22 a 24 min. después de empezar la incubación, y las proteínas marcadas se sometieron a coelectroforesis con las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA irradiado e infectado con  $\phi 29$  marcadas con leucina- $C^{14}$  en un pulso de los 21 a los 26 min. seguido de caza de otros 5 min. (Métodos g, 3 y 4).

La electroforesis se llevó a cabo en geles de 15 cm de longitud con acrilamida 12,5%, urea 8M y dodecil sulfato sódico 0,1% en un sistema de pH continuo, (Métodos m, 1).

( - - - o - - - ) Radioactividad de las proteínas marcadas en bacterias infectadas con  $\phi 29$ . ( — ● — ) Radioactividad de las proteínas marcadas en bacterias sin infectar.

Figura 27. - Coelectroforesis en sistema de pH discontinuo de las proteínas marcadas en B. subtilis sin infectar en un pulso de 22 a 24 min. frente a las proteínas marcadas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , en un pulso de 21 a 26 min. seguido de caza. -

Una mezcla de proteínas marcadas en B. subtilis en un pulso de 22 a 24 minutos con leucina- $H^3$ , y proteínas marcadas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , preparadas como se ha descrito en la figura 26, se sometieron a electroforesis en geles de 10 cm. de longitud con acrilamida 10% y dodecil sulfato sódico 0,1% en un sistema de pH discontinuo (Métodos m, 2).

(- - - o - - -) Radioactividad de bacterias infectadas

(—•—) Radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 28. - Péptidos trípticos de las proteínas P-NP1 y NP1. -

Una mezcla de proteína P-NP1 marcada con metionina- $S^{35}$  y de proteína NP1 marcada con metionina- $H^3$ , preparadas como se describe en Métodos, h, 1, se redujo, se carboximetiló, se trató con tripsina y se cromatógrafió en una columna Beckman PA-35 (Métodos h, 2). La cromatografía se desarrolló bajo presión con un gradiente lineal de piridina 0,2M-acético, pH3,1 y piridina 2M-acético, pH5,0. Las fracciones se recogieron en viales que contenían papel GF/A y se determinó la radioactividad total presente en cada una de ellas.

(- - -o- - -): P-NP1 marcada con  $S^{35}$ . (—●—): NP1 marcada con  $H^3$ .

Figura 29. - Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis infectado por el mutante ts B73 a 42°C.

B. subtilis 110NA irradiado e infectado con el mutante ts B73, se marcó con metionina- $S^{35}$  desde los 15 a

a los 30 minutos después de la infección a 42°C. Bacterias infectadas con fago Ø29 normal se marcaron al mismo tiempo con metionina- $H^3$  (Métodos g, 5, I). Las células se mezclaron y la coelectroforesis se llevó a cabo en geles de 10 cm con acrilamida 10% y dodecil sulfato sódico 0,1% en un sistema de pH discontinuo (Métodos, m, 2).

- (- - - o - - -) Radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.  
 (—•—) Radioactividad de bacterias infectadas con el mutante ts B73.

Figura 30. - Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis a 42°C. -

B. subtilis 110NA crecido a 42°C se marcó con metionina- $S^{35}$  desde los 15 a los 30 minutos, se mezcló con un lisado de B. subtilis 110NA infectado con Ø29 normal marcado con metionina- $H^3$ , y se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la figura 29.

- (- - - o - - -) Radioactividad de bacterias infectadas con fago normal.  
 (—•—) Radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 31. - Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis infectado con el mutante ts B66 a 42°C.

B. subtilis 110NA irradiado e infectado con el mutante ts B66, se marcó con metionina-S<sup>35</sup> desde los 15 a los 30 minutos después de la infección a 42°C. Bacterias infectadas con fago Ø29 normal se marcaron al mismo tiempo con metionina-H<sup>3</sup>. Las células se mezclaron y se sometieron a coelectroforesis en las condiciones descritas en la figura 29.

(---o---) Radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.

(---•---) Radioactividad de bacterias infectadas con el mutante ts B66.

Figura 31. - Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis infectado con el mutante ts B74 a 42°C.

B. subtilis 110 NA irradiado e infectado con el mutante ts B74 se marcó con metionina-S<sup>35</sup> desde los

15 a los 30 minutos después de la infección a 42°C. Bacterias infectadas con fago  $\phi 29$  normal se marcaron al mismo tiempo con metionina- $H^3$ . Las células marcadas se mezclaron y se sometieron a coelectroforesis en las condiciones descritas en la figura 29. (---o---) Radioactividad de bacterias infectadas con  $\phi 29$  normal. (—●—) Radioactividad de bacterias infectadas con el mutante ts B74.

Figura 33. - Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis infectado con el mutante ts B73 a 30°C. -

B. subtilis 110 NA irradiado e infectado con el mutante ts B73 se marcó con metionina- $S^{35}$  desde los 15 a los 30 minutos después de la infección a 30°C. Bacterias infectadas con  $\phi 29$  normal se marcaron en las mismas condiciones con metionina- $H^3$ . Las células marcadas se mezclaron y se sometieron a coelectroforesis en las condiciones descritas en la figura 29. (---o---) Radioactividad de bacterias infectadas con  $\phi 29$  normal. (—●—) Radioactividad de bacterias infectadas con el mutante ts B73.

Figura 34. - Estimación del peso molecular de las proteínas no estructurales inducidas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ . -

Se determinó corriendo en geles paralelos conteniendo 12,5% de acrilamida, urea 8M y dodecil sulfato sódico 0,1% las proteínas siguientes de peso molecular conocido: 1) quimotripsinógeno (20  $\mu$ gr), mioglobina (20  $\mu$ gr), citocromo c (20  $\mu$ gr), y los péptidos de bromuro de cianógeno del citocromo c (50  $\mu$ gr); 2) quimotripsinógeno (20  $\mu$ gr), inmunoglobulina G (20  $\mu$ gr) y seroalbúmina bovina (20  $\mu$ gr) y 3) las proteínas estructurales del fago  $\phi 29$  marcadas con leucina- $C^{14}$  (25.000 cpm).

(-- -- -c- -- --) Proteínas estructurales de  $\phi 29$   
 (- - - - ● - - -) Proteínas marcadoras no radioactivas.

Las flechas indican la posición de las proteínas no estructurales inducidas por  $\phi 29$ .

Figura 35. - Síntesis de RNA y proteína en un sistema libre de células de E. coli. -

La incubación se llevó a cabo como se describe en Métodos k, en presencia y ausencia de DNA lineal de  $\phi 29$ . A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 25  $\mu$ l y se determinó la radioactividad incorporada. a) Se añadieron 2  $\mu$ c de UTP- $H^3$  a 0,1 ml de mezcla de reacción, y se determinó la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% frío. b) Se añadieron 0,8  $\mu$ C de leucina- $H^3$  a un volumen de 0,2 ml y se determinó la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético caliente.

Figura 36. - Actividad tipo lisozima sintetizada en un sistema libre de células de E. coli dirigido por el DNA de  $\phi 29$ . -

La incubación se llevó a cabo en presencia y ausencia de DNA de  $\phi 29$ . A los tiempos indicados, se sacaron alícuotas de 50  $\mu$ l y se añadieron a filtros que contenían E. coli marcado con ácido diaminopimélico- $H^3$  (Métodos, l), que se incubaron durante 4 horas a 37°C. La radioactividad liberada de un filtro control sin añadir alícuota de los ensayos de síntesis de proteínas se restó en todos los casos. (---o---) Ensayo sin DNA; (—●—) Ensayo con DNA de  $\phi 29$ .



Figura 37. - Electroforesis de las proteínas sintetizadas in vitro en un sistema libre de células dirigido por el DNA de  $\phi 29$ .

Las proteínas sintetizadas in vitro en un ensayo dirigido por DNA de  $\phi 29$ , y en otro sin DNA, marcadas respectivamente con leucina- $C^{14}$  y leucina  $H^3$  (Métodos k), tratadas con RNasa y DNasa se mezclaron y se sometieron a electroforesis en geles conteniendo acrilamida 12,5%, urea 8M y dodecil sulfato sódico 0,1% (Métodos m,1)  
 (—●—) + DNA; (- - -o - - -) - DNA.

Figura 38. - Caracterización electroforética de las proteínas sintetizadas en un sistema libre de células dirigido por el DNA de  $\phi 29$ .

Una mezcla de proteínas sintetizadas in vitro con DNA de  $\phi 29$  marcadas con leucina- $C^{14}$  y de proteínas inducidas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , marcadas con leucina- $H^3$  en un pulso de 20 a 23 minutos (Métodos, g,2), se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la figura 37. (- - -o - - -) Proteínas inducidas in vivo por  $\phi 29$ ; (—●—) Proteínas sintetizadas in vitro con DNA de  $\phi 29$ .

Figura 39. - Localización de los mutantes sensibles a supresor sobre el mapa genético lineal de  $\phi 29$ .

Figura 40. - Desarrollo de mutantes sus en B. subtilis 110NA.

B. subtilis 110NA irradiado con luz ultravioleta se infectó con  $\phi 29$  normal o con distintos mutantes sus a una multiplicidad de 20 fagos por bacteria. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de los cultivos y se valoró el fago total presente sobre bacteria indicadora B. subtilis 168 MO-99 ( $su^+$ ) (Métodos c).

(—●—)  $\phi 29$  normal; (—○—) sus M1241r  
(—▲—) sus N212; (—△—) sus I44.

Figura 41. - Densitometría de las proteínas tempranas inducidas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , analizadas por electroforesis en pH discontinuo y autorradiografía

B. subtilis 110NA irradiado e infectado con el fago  $\phi 29$ , se marcó con una mezcla de aminoácidos- $C^{14}$

(Métodos g, 6) en un pulso de 5 a 13 minutos después de la infección. Un cultivo control de bacteria sin infectar se marcó en las mismas condiciones. Las proteínas marcadas se analizaron por electroforesis en geles con gradiente de acrilamida entre el 10 y el 20% y autorradiografía (Métodos m, 3). (————) Densitometría del autorradiograma de las proteínas inducidas en bacterias infectadas con  $\phi 29$ ; (- - - - -) Bacterias sin infectar. Se indican con una flecha las proteínas tempranas inducidas por el fago.

Figura 42. -Densitometría de las proteínas tardías inducidas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ , analizadas por electroforesis en pH discontinuo y autorradiografía. -

B. subtilis 110NA irradiado e infectado con  $\phi 29$  se marcó con una mezcla de aminoácidos-C14 en un pulso de los 20 a 28 minutos (Métodos g, 6). Las proteínas marcadas, se analizaron por electroforesis en geles de pH discontinuo en las condiciones descritas en la figura 41. (————) Densitometría correspondiente a bacterias infectadas con  $\phi 29$ ; (- - - - -) Bacterias sin infectar. Están indicadas las posiciones de las proteínas inducidas tempranas, y se señalan con una flecha las posiciones de las proteínas tardías.

Figura 43. - Densitometría de las proteínas estructurales del fago  $\phi 29$  y de cabezas vacías del fago. -

El bacteriófago  $\phi 29$  y las cabezas vacías obtenidas en los lisados procedentes de bacterias infectadas con  $\phi 29$ , marcados con leucina- $C^{14}$  y purificados como se describe en Métodos f, se sometieron a electroforesis en geles con gradiente de acrilamida del 10 al 20%, en presencia de dodecil sulfato sódico 0,1%. Los geles se secaron, se sometieron a autorradiografía, y posterior densitometría.

(————) Fago  $\phi 29$ ; (- - - -) cabezas vacías.

Figura 44. - Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus R629, sus F515, sus K91, sus O5 y sus Q626, marcadas en un pulso temprano. -

Diferentes cultivos de B. subtilis 110NA irradiado con luz ultravioleta se infectaron con los mutantes sus indicados, y las proteínas inducidas se marcaron con una mezcla de aminoácidos- $C^{14}$  con un pulso de 5 a 13 minutos (Métodos g, 6). Como control se marcaron de igual manera un cultivo infectado con  $\phi 29$  normal, y otro sin infectar. Las proteínas mar-

cadras, se analizaron por electroforesis en geles de gradiente de acrilamida entre el 10 y el 20%, en presencia de dodecil sulfato sódico. Los geles se secaron y se sometieron a autorradiografía como se describe en Métodos m, 3. Las flechas indican las proteínas que faltan en los distintos mutantes.

Figura 45. -Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus R629, sus F515, sus K91, sus O56 y sus Q 626, marcados en un pulso tardío. -

Las proteínas inducidas por estos mutantes se marcaron en las condiciones descritas en la figura 44, en un pulso de 20 a 28 minutos. El cultivo infectado con el mutante Q626, se marcó en un pulso adicional de los 35 a los 43 minutos (b). El resto de las condiciones experimentales, son las descritas en la figura 44. Las flechas indican las proteínas que faltan en los distintos mutantes.

Figura 46. - Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus J614, sus G769, sus A422r3, sus E136r3, sus H542 y sus B47, marcadas en un pulso temprano. -

Las proteínas inducidas por estos mutantes se marcaron en las condiciones descritas en la figura 44, mediante un pulso de 5 a 13 minutos y se analizaron por electroforesis en gradiente de acrilamida y autorradiografía (Métodos m, 3).

Figura 47. - Autorradiografía de las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por los mutantes sus J614, sus G769, sus A422r3, sus E136r3, sus H542 y sus B47, marcadas en un pulso tardío. -

Las proteínas inducidas por estos mutantes se marcaron y analizaron en las condiciones descritas en la figura 44, mediante un pulso de 20 a 28 minutos. Las flechas indican las proteínas que faltan en los distintos mutantes.

Figura 48. - Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA infectado con el fago  $\phi 29$ .

B. subtilis irradiado e infectado con  $\phi 29$  se marcó con leucina- $C^{14}$  desde el minuto 20 al 28 después de la infección. Un control de bacterias sin infectar se marcó en las mismas condiciones con leucina- $H^3$ . (Métodos g, 6). Se mezclaron alícuotas de los dos cultivos y se sometieron a electroforesis en geles de gradiente de acrilamida entre el 10 y el 20% en presencia de dodecil sulfato sódico 0,1%. Los geles se procesaron como se describe en Métodos m, 1. (—●—) Proteínas inducidas en B. subtilis infectado con  $\phi 29$ . (- - -o- - -) Proteínas marcadas en B. subtilis sin infectar.

Figura 49. - Radioactividad específica de  $\phi 29$  en geles de gradiente de acrilamida.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por  $\phi 29$ , que se muestran en la figura 48, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (99)

Figura 50. -Coelectroforesis de las proteínas inducidas por el mutante sus E136r3 frente a las proteínas estructurales del fago  $\phi 29$ . -

Las proteínas inducidas por el mutante sus E136r3 marcadas con leucina- $C^{14}$  como se describe en Métodos g, 6 se mezclaron con fago  $\phi 29$  marcado con mezcla de aminoácidos- $H^3$  y purificado como se describió en Métodos, f, y se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la figura 48.

(—●—) proteínas inducidas por el mutante sus E136r3; (- - - o - - -) proteínas estructurales de  $\phi 29$ .

Figura 51. - Coelectroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA infectado con el mutante sus E136r3 y de las proteínas marcadas en bacterias sin infectar. -

B. subtilis 110NA irradiado e infectado con el mutante sus E136r3, se marcó con leucina- $C^{14}$  desde el minuto 20 al 28 después de la infección. Un control de bacterias sin infectar se marcó en las mismas



condiciones con leucina- $H^3$  (Métodos g, 6), y se mezcló con las bacterias infectadas, para someterlas a coelectroforesis en las condiciones de la figura 48. (—●—) Proteínas inducidas por el mutante sus E136r3; (- - - o - - -) Proteínas marcadas en B. subtilis 110NA sin infectar.

Figura 52. - Radioactividad específica del mutante sus E136r3 en geles de gradiente de acrilamida. -

La radioactividad específica de las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA por el mutante sus E136r3, que se muestran en la figura 51, se calculó por el método de Mayol y Sinheimer (99).

Figura 53. - Coelectroforesis de las proteínas inducidas por el mutante sus H542 frente a las proteínas estructurales del fago  $\phi 29$ . -

Las proteínas inducidas por el mutante sus H542 marcadas con leucina- $C^{14}$  (Métodos g, 6), se mezclaron con fago  $\phi 29$  marcado con mezcla de aminoá

cidos- $H^3$  y purificado como se describe en Métodos f, y se sometieron a coelectroforesis en las condiciones descritas en la figura 48.

(—●—) Proteínas inducidas por el mutante sus H542; (—o—) Proteínas estructurales de  $\phi 29$ .

Figura 54. - Coelectroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA infectado con el mutante sus H542 y de las proteínas marcadas en bacterias sin infectar. -

B. subtilis 110NA irradiado e infectado con el mutante sus H542, se marcó con leucina- $C^{14}$  desde el minuto 20 al 28 después de la infección. Un control de bacterias sin infectar se marcó en las mismas condiciones con leucina- $H^3$  (Métodos g, 6), se mezcló con las bacterias infectadas y se sometió a coelectroforesis en las condiciones descritas en la figura 48.

(—●—) Proteínas inducidas por el mutante sus H542; (—o—) Proteínas marcadas en B. subtilis 110NA sin infectar.

Figura 55. - Radioactividad específica del mutante sus H542 en geles de gradiente de acrilamida. -

La radioactividad específica de las proteínas inducidas en B. subtilis 110NA por el mutante sus H542, que se muestran en la figura 54, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (99).

Figura 56. - Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus I44r3, sus L53, sus L55r3, sus M1241r3, sus N212, sus D241r3 y sus P112 marcadas en un pulso temprano. -

Distintas alícuotas de un cultivo de B. subtilis 110NA irradiado con luz ultravioleta se infectaron con los mutantes sus indicados y las proteínas inducidas se marcaron mediante un pulso de 5 a 13 minutos (Métodos g, 6). Como control, se marcó de igual manera un cultivo infectado con  $\phi$ 29 normal, y otro sin infectar. Las proteínas marcadas se analizaron por electroforesis en placa de gel de acrilamida (gradiente entre el 10 y el 20%), y posterior autorradiografía (Métodos m, 3). Las flechas indican las proteínas que faltan en los distintos mutantes.

Figura 57. - Autorradiografía de las proteínas inducidas por los mutantes sus I44r3, sus L53, sus L55r3, sus M1241r3, sus N212, sus D241r3 y sus P112, marcadas en un pulso tardío. -

Las proteínas inducidas por los mutantes indicados, se marcaron en las condiciones descritas en la figura 56, en un pulso de 20 a 28 minutos. El cultivo infectado con el mutante sus M1241r3 se marcó en un pulso adicional de los 35 a los 43 minutos(b). Las condiciones experimentales para el análisis de las proteínas marcadas, son las descritas en la figura 56. Las flechas indican las proteínas que faltan en los distintos mutantes.

Figura 58. - Desarrollo de los mutantes tsI810 y ts J116 en B. subtilis 110NA a 30° y 42°C. -

B. subtilis 110NA irradiado con luz ultravioleta se infectó con los mutantes tsI810 y ts J116, y se separaron alícuotas que se incubaron a 30° y 42°C. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de los cultivos, y se valoró el fago total presente sobre

bacteria indicadora B. subtilis 110NA a 30°C  
(Métodos, c).

(---□---) Ø29 normal; (—●—) tsI810,  
30°C; (—▲—) ts I810, 42°C; (---○---)  
ts J116, 30°C; (---△---); ts J116, 42°C.

Figura 59. - Autorradiografía de las proteínas inducidas por el mutante ts I810 en condiciones permisivas y restrictivas. -

Dos cultivos de B. subtilis 110NA irradiado, uno infectado con el mutante tsI810 y otro sin infectar, se dividieron en alícuotas que se incubaron a 30°C y 42°C (temperatura permisiva y restrictiva respectivamente para el mutante ts). Las alícuotas incubadas a 30°C se marcaron mediante un pulso de 20 a 28 minutos después de la infección con leucina  $C^{14}$ , y las incubadas a 42°C se marcaron de igual manera en un pulso del minuto 10 al 18. Un cultivo infectado con Ø29 normal, se incubó a 42°C y se marcó del minuto 10 al 18 con leucina- $C^{14}$  (Método g, 5).

Las proteínas marcadas, se analizaron en las condiciones descritas en la figura 56.

Figura 60. - Autorradiografía de las proteínas inducidas por el mutante ts J116 en condiciones permisivas y restrictivas. -

Dos cultivos de B. subtilis 110NA irradiado, uno infectado con el mutante tsJ116 y otro sin infectar, se dividieron en alícuotas que se incubaron a 30° y 42°C. Las alícuotas incubadas a 30° se marcaron con leucina-C<sup>14</sup> mediante un pulso de 40 a 48 minutos después de la infección, y las incubadas a 42°C, se marcaron de igual manera en un pulso del minuto 20 al 28. Un cultivo infectado con ø29 normal, incubado a 42°, se marcó del minuto 20 al 28 con leucina-C<sup>14</sup> (Métodos g, 5). Las proteínas marcadas se analizaron en las condiciones descritas en la figura 56.

Figura 61. - Mapa genético lineal de ø29: Correlación gen-proteína y dirección de transcripción. -

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. - Berissi, H., Groner, Y. and Revel, M. Nature N.B. 234, 44 (1971)
2. - Lee-Huang, S. and Ochoa, S., Nature N.B. 234, 236 (1971).
3. - Groner, Y, Pollack, Y. Berissi, H. and Revel, M. Nature N.B. 239, 16 (1972).
4. Summers, W.C. and Siegel, R.B., Nature 223, 1111(1969).
5. - Chamberlin, M, Mc Grath, J. and Waskell, L., Nature 228, 227 (1970).
6. - Dunn, J.J., Bautz, F.A., and Batuz, E.F.K., Nature N.B. 230, 94 (1971).
7. - Maitra, U., Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 443 (1971)
8. - Pulitzer, J.F. and Geiduschek, E.P., J. Mol. Biol. 49, 489 (1970).
- 9.- Szybalski, W., Boure, K., Fianot, M, Hayes, S., Hradecna, Z, Kumar, S., Lozeron, H.A., Nijkamp, H.J.J. and Stevens, W.F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 341 (1970).



10. - Champoux, J.J. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 35, 319 (1970).
11. - Herskowitz, I. and Signer, E., Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 35, 355 (1970).
12. - Murialdo, H. and Siminovitch, L., Virology 48, 785 (1972).
13. - Anderson, D.L., Hickman, D.D. and Reilly, B.E., J. Bacteriol, 91, 2081 (1966).
14. - Anderson, D.L. and Moshafarra, E.T., J. Virol. 2, 1185 (1968).
15. - Ortin, J., Viñuela, E., Salas, M. and Vasquez, C. Nature N.B. 234, 275 (1971).
16. - Studier, F.W., J. Mol. Biol. 11, 373 (1965).
17. - Burgi, E. and Hersey, A.D., Biophys. J. 3, 309 (1963).
18. - Thomas, C.A. Jr. and Mac Hattie, L.A. Ann. Rev. Biochem. 36, 485 (1967).

- 19.- Chamberlin, M. and Berg, P., P., J. Mol. Biol. 8, 297 (1964).
- 20.- Hayashi, M., Hayashi, M.N. and Spiegelman, S., Proc. Natl. Acad. Sci. US., 51, 3513 (1969).
- 21.- Geidusoheck, E.P., Tocchini-Valentini, G.P. and Sarnat., R.T., Proc. Nat. Acad. Sci US., 52, 486 (1964).
- 22.- Mendez, E., Ramírez, G., Salas, M. and Viñuela, E., Virology 45, 567 (1971).
- 23.- Wood, W.B., Edgar, R.S, King, J., Lielansis, I., and Henninger, M. Federation Proc., 27, 1160 (1968).
- 24.- Hagen, E.W., Zeeze, V. M. and Anderson, D.L., Virology 43, 561 (1971).
- 25.- Talavera, A., Jiménez, F., Salas, M. and Viñuela, E., Virology 46, 586 (1971).
- 26.- Reilly, B.E., Zeece, V.M and Anderson, D.L., J. Virol, 11, 756 (1973).

- 27.- Mc Guire, J.C., Pène, J. J. and Barrow-Carraway.  
J. Virol 13, 690 (1974).
- 28.- Moreno, F. Camacho, A., Viñuela, E. and Salas M.  
Virology 62, 1 (1974).
- 29.- Moreno, F., Mellado, R.P., Viñuela, E., Salas, M.,  
Reilly, B.E. y Anderson, D.L., en preparación.
- 30.- Hosoda, J. and Levintahl, C., Virology 34, 709 (1968).
- 31.- Mc. Corquodale, A.J., Oleson, A.E. and Buchanan,  
J.M. en "The Molecular Biology of Viruses" ed. por  
J.S. Corter y W. Paranchych, Academic Press, New  
York (1967).
- 32.- Studier, F.W. and Maizel, J.V.Jr., Virology 39, 575  
(1969).
- 33.- Hendrix, R.W. en "The Bacteriophage Lambda", Ed. por  
A.D. Hersey, p 355. Cold Spring Harbor Laboratoy (1971).
- 34.- Pthashne, M., Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 306 (1967).
- 35.- Burgess, A.B. and Denhart, D.T., J. Mol. Biol. 44,  
377 (1969).

36. - Gelfand, D.H. and Hayashi, M., J. Mol. Biol. 44, 501 (1969).
37. - Hermoso, J.M. , Tesis Doctoral, 1971.
38. - Schachtele, C.F., De Sain, C.V. Hawley, L.A. and Anderson, D.L. J. Virol. 10 , 1170 (1972).
39. - Schachtele, C.F., De Sain, C.V. and Anderson. D.L., J. Virol. 11, 9 (1973).
40. - Loskutoff, D.J., Péne, J.J., and Andrews, D.P.J. Virol 11, 78 (1973).
41. - Loskutoff, D. J. and Péne, J.J., J. Virol. 11, 87 (1973).
42. - Moshafarra, E.T., Sachachtele, C.F., Reilly, B.E. and Anderson, D.L., J. Virol. 6, 855 (1970).
43. - Jiménez, F. resultados no publicados.
44. - Laemmli, U.K., Molbert, E., Showe, M. and Kellenberger, E. J. Mol. Biol. 49, 99 (1970).

45. - Eiserling, F.A. and Dickson, R.C. *Ann Rev. Biochem.* 41, 467 (1972).
46. - Dickson, R., Barnes, S and Eiserling, F., *J. Mol. Biol.* 53, 461 (1970).
47. - Hosoda, J. and Cone, R., *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 66, 1275 (1970).
48. - Kellenberger, E. and Kellenberger-Vander Kamp, C. *Fed. Eur. Biol. Soc. Lett.* 8, 140 (1970).
49. - Laemmli, U.K., *Nature* 227, 680 (1970).
50. - Showe, M., and Black, L. *Nature N.B.* 242, 70 (1973).
51. - Hendrix, R.W. and Casjens S.R., *Proc. Nat. Acad. Sci US.* 71, 1451 (1974).
52. - Hendrix, R.W. and Casjens, S.R., *Virology* 61, 156 (1974).
53. - Lengyel, J., Goldstein, R., Marsh, M., Sunshine, M. and Calendar, R., *Virology* 53, 1 (1973).
54. - Zweig, M. and Cummings, D., *J. Mol. Biol.* 80, 505 (1973).

55. - Anderson, C.W., Baum, P.R. and Gesteland, R.F.,  
J. Virol. 12, 241 (1973).
56. - Dobos, P. and Plourde, J.Y., Eur. J. Biochem. 39, 463  
(1973).
57. - Jones, K.J., Waite, M.R.F. and Bose, M.R., J. Virol  
13, 809 (1974).
58. - Friedmann, T., Proc. Nat. Acad. Sci. US. 71, 257 (1974)
59. - Konings, R.N.H, FEBS letters 35, 155 (1974).
60. - Model, P., and Zinder, N.D., J. Mol. Biol. 83, 231  
(1974).
61. - Zubay, G. and Chambers, D.A., Cold Spring Harbor,  
Symp. Quant. Biol. 34, 753 (1969).
62. - Dohan, F.C. Jr. Rubman, R.M., and Torriani, A, Cold  
Spring Harbor, Symp. Quant. Biol 34, 768 (1969).
63. - Gold, L.M., and Schweiger, M., J. Biol. Chem. 245,  
2255 (1970).

64. - Schweiger, M. and Gold, L.M., J. Biol. Chem. 245, 5022 (1970).
65. - Schweiger, M. and Gold, L.M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 63, 1351 (1969).
66. - Hagen, F., and Young, E.T., Virology 55, 231 (1973).
67. - Carrascosa, J.L., Jiménez, F., Viñuela, E. and Salas, M. Eur. J. Biochem, 51, 587 (1975).
68. - Campbell, A., Virology 14, 22 (1961).
69. - Epstein, R.H., Bolle, A, Steinberg, C.M., Kellenberger, E., Boy de la Tour, E., Chevalley, R., Edgar, R.S., Sussman, M., Denhart, C.H. and Lielansis, A. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 375 (1963).
70. - Capecchi, M.R. and Gussin, G.N., Science 201, 13 (1964)
71. - Sarabhai, A.S., Stretton, A.O.W., Brenner, S. and Bolle, A. Nature 201, 13 (1964).
72. - Parkinson, J.S., Genetics 59, 311 (1968).

73. - Mac Kinlay, A.G. and Kaiser, A.D., J. Mol. Biol. 39, 679 (1969).
74. - Mount, D.W.A., Harris, A.W., Fuerst, C.R. and Siminovitch, L. Virology 35, 134 (1968).
75. - Botstein, D., Wadwell, C.H., and King, J., J. Mol. Biol. 80, 669 (1973).
76. - Casjens, S. and Hendrix, R.J., J. Mol. Biol. 90, 20 (1974).
77. - Inciarte, M.R., Sogo, J.M., Corral, J., Salas, M. y Viñuela, E., resultados no publicados.
78. - Georgopoulos, C.P., J. Bacteriol. 97, 1397 (1969).
79. - Michel, J.F. and Cami, B., Ann. Inst. Pasteur, 116, 3 (1969).
80. - Young, E.T., and Sinsheimer, R.L., J. Mol. Biol. 30, 168 (1967).
81. - Dubnan, D., Goldwaite, C., Simth, J. and Marmur, J. J. Mol. Biol. 27, 163 (1967).



- 82.- Coleman, G., Biochem. J. 112, 533 (1969).
- 83.- Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J., J. Bacteriol. 81, 741 (1961).
- 84.- Rubio, V., Salas, M., Viñuela, E. and Usobiaga, P., Saiz, J.L. and Llopis, J.F., Virology 57, 112 (1974).
- 85.- Adams, M.H., Bacteriophages, Interscience Publishers, Inc. New York (1950).
- 86.- Jacobson, M.F., Asso, J. and Baltimore, D., J. Mol. Biol. 49, 657 (1970).
- 87.- Gold, L.M. and Schweiger, M. en Methods in Enzymology 20, 537 (1971). Ed. por K. Moldave y L. Grossman. Academic Press, N.Y.
- 88.- Abelson, J. and Thomas, C.A. Jr., J. Mol. Biol. 18, 262 (1968).
- 89.- Herrlich, P. and Schweiger, M. en Methods in Enzymology 30, 654 (1974). Ed. por K. Moldave y L. Grossman, Academic Press, N. Y.

- 90.- Swank, R.T. and Munkres, K.D., *Analytical Biochem.*,  
39, 462 (1971).
- 91.- Maizel, J.V., Jr. en *Fundamental Techniques in Virology*,  
p.334. Ed. por Habel K. y Salzman N.P. Academic Press  
New York (1966).
- 92.- Fairbanks, G., Levinthal, C. and Reeder, R.H., *Biochem  
Biophys. Res. Commun.* 20, 393 (1965).
- 93.- Loening, U.E., *Biochem. J.* 102, 251 (1967).
- 94.- Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F.H.,  
*Biochemistry* 10, 2606 (1971).
- 95.- Shapiro, A.L., Viñuela, E. and Maizel, J.V., Jr.,  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815 (1967).
- 96.- Gross, E. in *Methods en Enzymology* 11, 238 (1967).  
Ed. por C.H.W. Hirs. Academic Press. N.Y.
- 97.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fau, A.L. and Randall,  
R.J., *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).

98. - Camacho, A., Carrascosa, J.L., Viñuela, E. y Salas, M.  
enviado a Anal. Biochem.
99. - Mayol, R.F. and Sinsheimer, R.L., J. Virol. 6, 310 (1970)
100. - Camacho, A., Moreno, F., Carrascosa, J.L., Viñuela, E.  
and Salas, M., Eur. J. Biochem. 47, 199 (1974).
101. - Inciarte., M.R. y Carrascosa, J.L., resultados no pu-  
blicados.
102. - Guha, A. and Szybalski, W., Virology 34, 608 (1968).
103. - Ortin, J., Viñuela, E. y Salas, M., resultados no pu-  
blicados.
104. - Blattner, F. and Dahlberg, J., Nature N.B. 237, 227 (1972).
105. - Nichols, J.L., Nature 225, 147 (1970).
106. - Talavera, A., resultados no publicados.
107. - Bessler, W., Freund-Molbert, E., Knüfermann, H.,  
Rudolph, C., Thurrow, T. and Stirm, S., Virology 56,  
134 (1973).

108. - Legault-Demare, L., and Chambliss, G.H., J. of Bacteriol. 120, 1300 (1974).
109. - Hezberg, M. and Winocour, E., J. Virol. 6, 607 (1970).
110. - Botchan, P., Wang, J., and Echols, H., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 3077 (1973).
111. - Weidell, W. and Katy, N.Z., Naturforsh 16, 156 (1961).
112. - Black, W. and Hogness, D.S., J. Biol. Chem. 244, 1968 (1968).
113. - Tsugita, A., Inonye, M., Terzaghi, E. and Streisinger, G., J. Biol. Chem. 243, 391 (1968).
114. - Pryme, I.F. and Berentsen, S.A., Biochem. Biophys. Acta 204, 630 (1970).
115. - Studier, F.W., Science, 176, 367 (1972).
116. - Hofstetter, H., Biochim. Biophys. Acta 374, 238 (1974)