

EL REPRESOR DEL FAGO LAMDA DE LA *ESCHERICHIA COLI* DURANTE EL ESTADO DE LISOGENIA UNA PROTEINA ALOSTERICA EN LA REGULACION GENETICA

Gerardo E. Serrato Ch. *

Resumen

Esta revisión analiza el mecanismo de represión del fago Lamda de la E. coli durante el estado de lisogenia. Se caracteriza el polipéptido represor del colifago, cuya presencia activa es necesaria para la expresión del gene regulador de la síntesis proteica a partir del DNA del fago. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1(1):33-40, 1980).

Introducción

El esclarecimiento del mecanismo de la síntesis proteica, tanto en células procariocíticas como eucariocíticas ha tenido lugar durante los últimos quince años, llegando a ser uno de los mayores logros de la Bioquímica Molecular. La formación del enlace peptídico es el principal evento químico en la síntesis proteica y está determinado por una maquinaria sofisticada para la precisa translación de las secuencias de bases programadas por los ácidos nucleicos.

Hasta hace poco tiempo, era difícil explicar por qué las células no continuaban produciendo todo el tiempo el total de las proteínas (incluyendo a las enzimas). Algunas de éstas se sintetizaban sólo cuando la célula las necesita, asumiéndose que ciertas porciones de la molécula de DNA llegan a estar inactivas.

Un posible mecanismo regulador de la síntesis proteica fue propuesto por Jacob y Monod (3, 8, 9). Ellos sugieren que un grupo de genes estructurales o cistrones ubicados en sectores vecinos a lo largo de la molécula de DNA y ligados estrechamente en el mapa genético, forman lo que se denomina un operón, el cual está bajo el control de un gene operador que se halla en una posición estratégica con respecto al operón por él controlado.

Cuando el operador está abierto, cada cistrón del operón sintetiza su respectivo ARNm. que a su vez controlará la síntesis de una cadena polipeptídica (Fig. 1). Si el operador está cerrado, no hay síntesis de ARNm ya que el operador está unido a un represor citoplasmático que bloquea la translación. Este represor es el producto de un gene regulador, así, el represor actúa negativamente en el sentido de que su forma activa inhibe la síntesis proteica.

La actividad de los represores está gobernada por metabolitos específicos llamados efectores. En el caso de las enzimas inducibles, el inductor actúa como efector inactivando al represor, quedando así el gene operador libre y por tanto se produce la síntesis proteica (12).

Otro tipo de represor es el apo-receptor participante en la regulación de las enzimas represibles. éstos son activados por la presencia de su efector, tal y como sucede en los mecanismos de retroalimentación (Fig. 2).

* Hospital San Vicente de Paul, Caja Costarricense de Seguro Social, Heredia, Costa Rica.

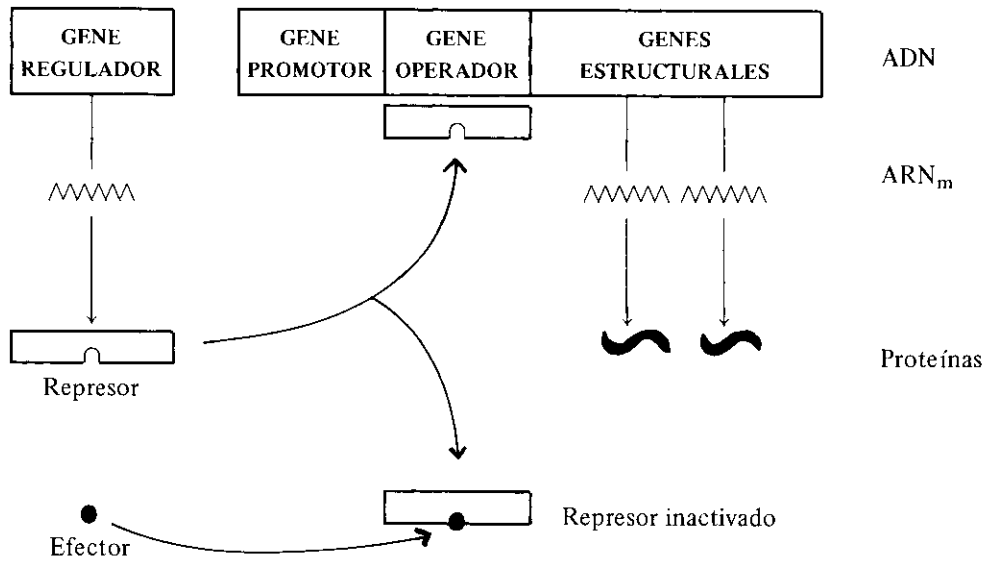


Fig. 1. Esquema del funcionamiento del sistema operón en las enzimas inducibles. (Davidson, 1969. Methuen, 9^o Ed.).

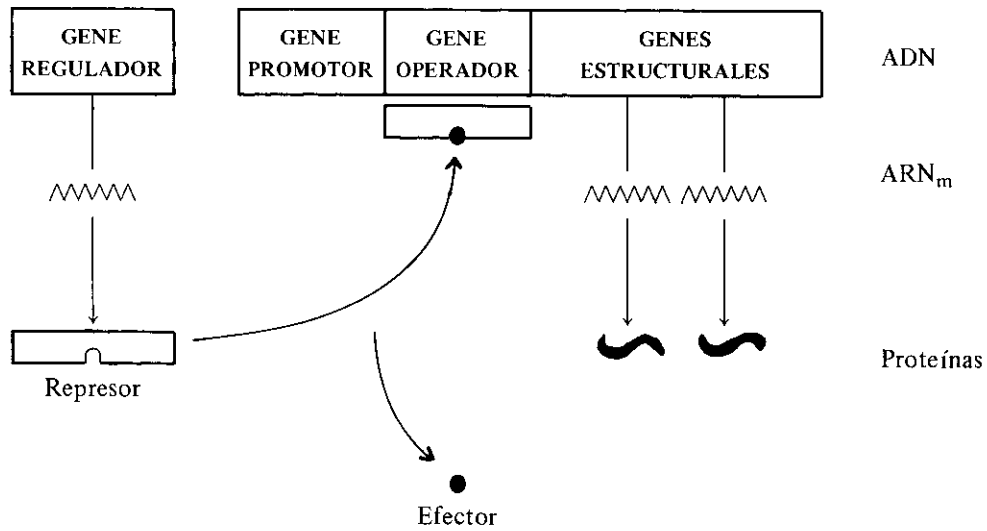


Fig. 2. El sistema del operón no es activado hasta que el represor no se une al efector. (Davidson, 1969, Methuen 9^o Ed.).

Los represores poseen dos o por lo menos dos sitios alostéricos, uno con afinidad por la secuencia de nucleótidos del correspondiente gene operador, el otro por la molécula del efector, de modo que cuando este último se une a las moléculas del represor, la afinidad de éste por el gene operador se ve modificada (4, 18).

Ejemplos de estos mecanismos estudiados con gran amplitud son el operón de la lactosa en la bacteria *Escherichia coli* y el de la histidina en *Salmonella typhimurium* (5).

En nuestra revisión trataremos de dislucidar el mecanismo de represión del fago Lamda de *E. coli* durante el estado de lisogenia (14). Este virus ha sido de gran utilidad como amia de trabajo en el desarrollo de la Genética Bioquímica, debido a la simplicidad de su mapa genético el cual está formado por un solo cromosoma, constituido por muy escasos genes (Fig. 3). Por otro lado, se tiene la misma facilidad de obtención y manipulación tanto del virus como de su célula huésped.

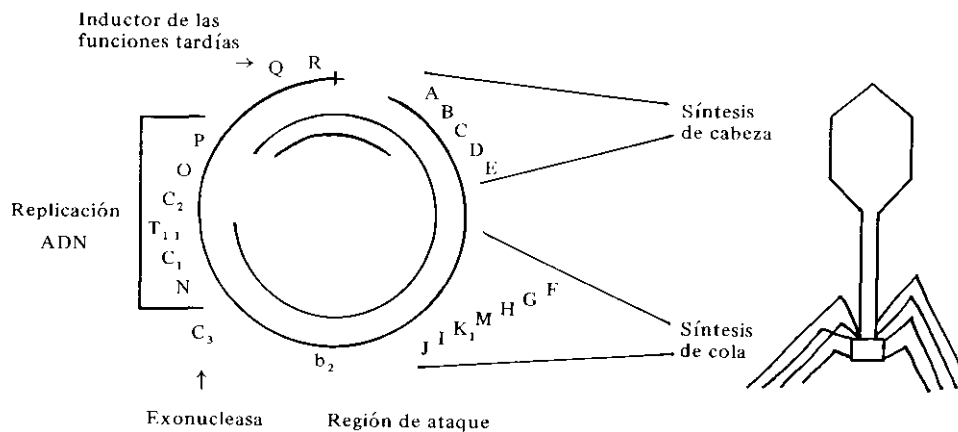


Fig. 3. Mapa Genético y Funcional del Fago Lamda (Dove, 1966; Joiner et all, 1967).

Definición del estado de lisogenia

Dos clases de virus pueden distinguirse en base a su relación con la célula huésped (1). La primera es que el fago virulento produce un tipo de infección que culmina con la destrucción de la célula parasitada y la liberación de partículas virales maduras o viriones. La segunda incluye los fagos temporales que pueden dar tres efectos diferentes: a) producción de un fago activo y su liberación por lisis celular; b) una infección abortiva en la cual el virus no se reproduce y desaparece; c) una infección no lítica en la que el virus permanece en forma inactiva incorporado al material genético de la célula huésped indefinidamente (lisogenia).

Esta es una clase de estadio de portador en la cual el fago virulento coexiste con una bacteria resistente al fago. La forma en que el virus persiste en la bacteria lisogénica se denomina pro-virus o pro-fago. La presencia del pro-fago confiere a la célula huésped resistencia a una futura infección contra fagos homólogos y sus variantes (Lwoff, 1953).

Propiedades y constitución del colifago Lamda

El represor del colifago Lamda es una molécula polipeptídica, con un peso molecular de 28.000 como monómero y cuatro veces superior como tetrámero. El coeficiente de sedimentación como oligómero es de 6,2 S y como monómero 2,4 S. Su concentración intracelular es de 10^{-7} moles por litro (2).

Pareciera que el represor Lamda existe en solución como monómero, dímero o tetrámero en un rápido equilibrio. Si se aumenta la concentración del represor, se favorece el equilibrio hacia la forma de tetrámero. El monómero no se une al ADN del fago, pero cuando se halla asociado como dímero, se une al gene operador en una constante de equilibrio de 3×10^{-4} moles por litro para la reacción $R_2 + O_p = R_2 O$.

Poco se conoce sin embargo acerca de la forma molecular que en altas concentraciones o *in vitro* interactúa con el gene operador.

In vitro, la vida media correspondiente a la asociación represor gene operador es tan solo de 10 minutos, pero si se utiliza el ADN completo del fago ésta sube a 170 minutos (14).

El mecanismo regulatorio de síntesis, no bien claro hasta el momento, parece que sigue el mismo esquema propuesto por Jacob y Monod para las proteínas (3,8,9).

Las experiencias realizadas por Spiegelman (17) demuestran que la expresión del gene regulador es dependiente de la presencia de la forma activa del represor Lamda. *In vitro*, como inductores de la pérdida del estado de lisogenia se ha empleado, entre otros, análogos de nucleótidos como la 6-fluorodeoxiuridina, cambios en temperatura y pH así como radiaciones ultravioleta (16).

Especificaciones de interacción entre el represor y el gene operador

La mayoría de las experiencias tratan de demostrar que el represor regula específicamente a una secuencia de bases púricas o pirimídicas. Para poner de manifiesto este tipo de unión han sido de gran utilidad los mutantes del fago Lamda ya que en éstos el represor no se incorpora formando un complejo de ADN represor por haber alteraciones en la secuencia de las bases a nivel de gene operador (1, 14).

Otro tipo de experiencia fue llevado a cabo elegantemente en el Instituto Salk para estudios biológicos, empleando ADN fágico Lamda y represor radiocactivo. Ante la mezcla de ambos y posterior ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, se notó que una gran parte del represor sedimentaba unido al ADN, mientras que aparecía otra fracción que pertenecía al represor libre (Fig. 4). Si se sustituye el DNA del fago Lamda por el de mutantes, u otro tipo de represor, no hay unión, permaneciendo este último en solución (Riggs y cols.) (16).

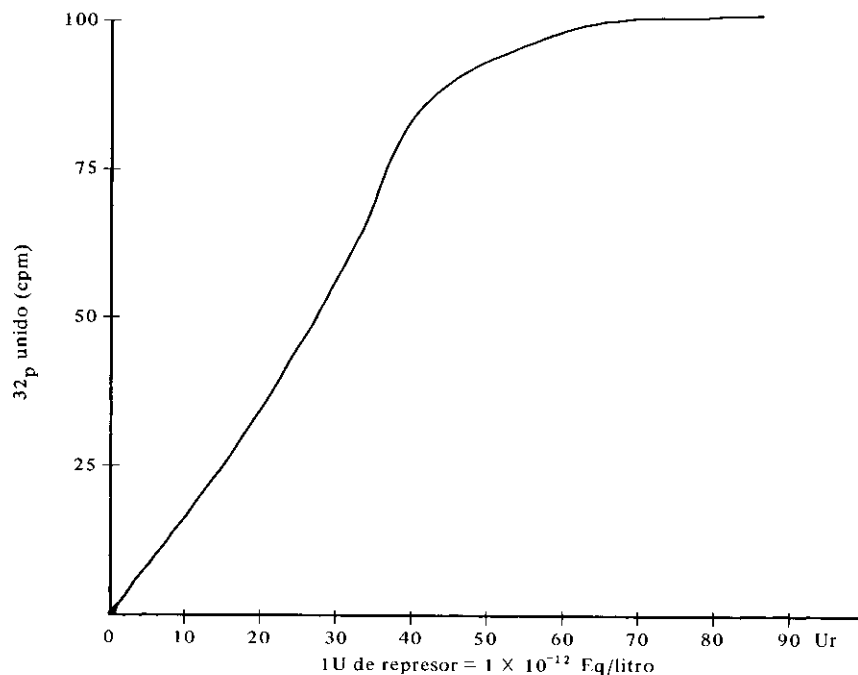


Fig. 4. Especificidad entre el represor Lamda y el gene operador. (Ptashne 1970) Scien. Amer. 22; 6, 36–44.

Forma activa del represor del fago Lamda

Chadwick (14) y Pirrotta (2) demuestran que la unión del represor al DNA del fago, da curvas de tipo sigmoideo, semejantes a las del efecto Bohr en las curvas de saturación de la hemoglobina (13), lo cual sugiere que hay un efecto cooperativo entre las diferentes subunidades (protómeros) de la molécula del represor (Fig. 5).

Pirrotta propone una ligera explicación en base a dos posibles modelos moleculares: a) los monómeros se unen individualmente pero en forma cooperativa al gene operador; b) los monómeros se asocian para formar un oligómero libre, el cual, posteriormente se une al gene operador.

Modo de acción del represor del fago Lamda

Herskowitz y Signer (7), dicen que el represor se une a los diferentes genes operadores bloqueando la transcripción de los dos sets de genes tempranos, leídos en direcciones opuestas (Fig. 6). En otras palabras, el represor impide que la RNA-polimeraza DNA dependiente transcriba el mensaje genético contenido en la molécula del DNA del fago, a una molécula de RNA mensajero, el cual es traducido a nivel de ribosomas en las proteínas virales “tempranas” necesarias para la síntesis de las proteínas “tardías”, por lo que permanece el virus en estado de profago y la célula huésped en lisogenia (16).

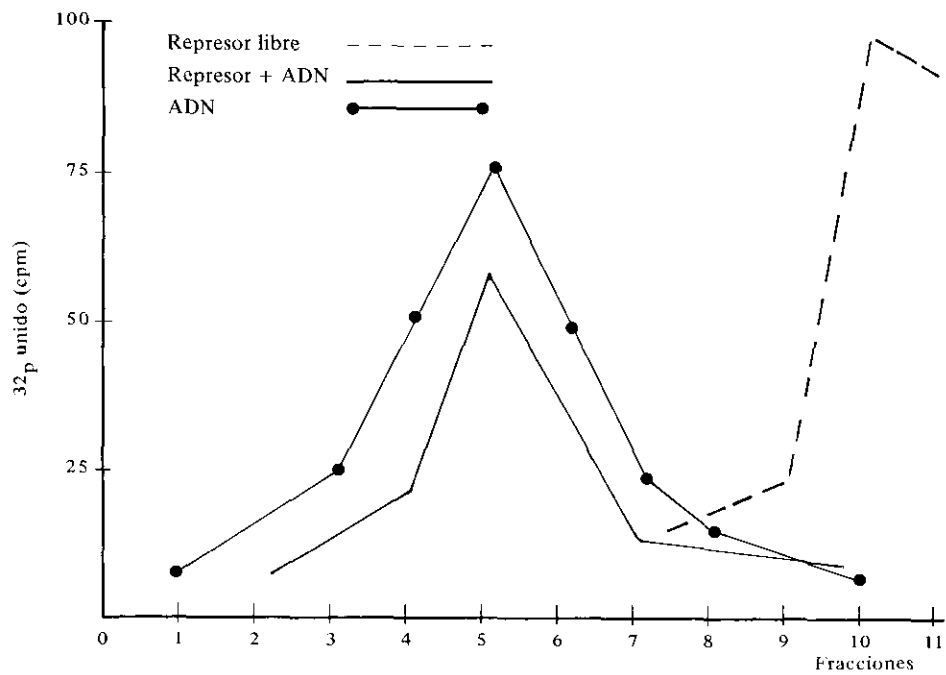


Fig. 5. Curva de unión entre el gene operador y el represor. (Pirrotta, 1970. Nature: 244, 13-18).

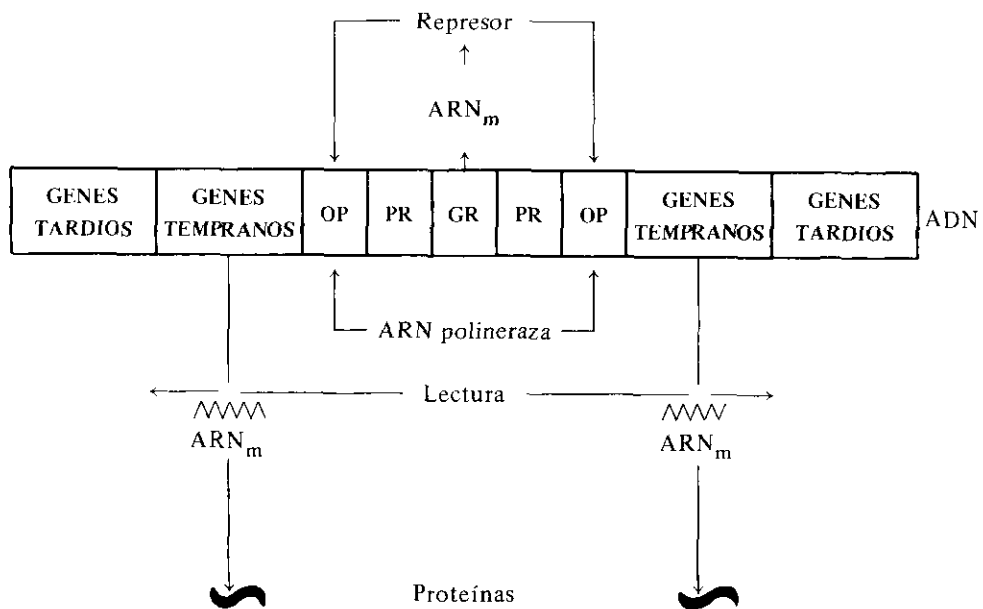


Fig. 6. Representación esquemática del operón y su control por el represor Lamda. (Pthasne, Guilberth, 1970. Scientific American: 22: 6, 36-44).

Discusión

Los genes no operan continuamente, debido a que lo hacen en forma intermitente dependiendo de las necesidades fisiológicas de la célula, debido a un mecanismo adecuado de regulación.

En la actualidad, se han aislado los primeros represores que vienen a confirmar la hipótesis lanzada por Jacob y Monod hace una década y que fue discutida en la introducción de este trabajo.

Tratamientos adecuados como el efecto de la luz ultravioleta entre otros, provocan que el fago Lamda retorne a su estado lítico, creyéndose que este efecto se deba a la producción de una molécula pequeña (un inductor), el cual inactiva al represor al producir alteraciones conformacionales en dicha molécula (Ptashne, Gilbert) (15).

Como en nuestra revisión se comenta, el mecanismo regulatorio del estado de lisogenia del fago Lamda corresponde a un mecanismo que implica la presencia de una proteína alostérica actuando como represor genético.

Es conveniente revisar de forma rápida los requisitos que debe cumplir una proteína para ser considerada como alostérica en términos de su estructura molecular (10).

- a. Estar constituida por unidades idénticas llamadas protómeros.
- b. El arreglo espacial de éstos deberá ser de tal forma que no puedan ser diferenciados unos de otros, lo que implica por lo menos uno o más ejes de simetría.
- c. Dos o por lo menos dos estadios conformacionales.
- d. Estas transformaciones tienden a guardar la simetría molecular, es decir, la equivalencia de los protómeros.

Así, se ha observado que la estimulación por inductores adecuados, provoca cambios conformacionales en la estructura del represor, pasando éste, del estado de asociación (forma activa) al de monómeros (forma inactiva).

Los gráficos de las curvas de unión entre el represor y el DNA del fago Lamda, abogan a favor de un efecto cooperativo entre las diferentes subunidades (2).

En relación a la elevada especificidad funcional, está bien demostrada la gran afinidad por una determinada secuencia de bases en el gene operador, ya que al alterar la síntesis de represor, se traducen en una inoperancia de este último (17).

Es necesario mencionar que este ejemplo no es el primer sistema de regulación que se describe en la *Escherichia coli*, ya que hace bastante tiempo fue descrito en forma similar el represor de la lactosa.

Agradecimientos

A los doctores Elena Morúa directora de la Cátedra de Biología Molecular de la Universidad de Costa Rica y Emer Alfaro G. director de Laboratorio Clínico del Hospital La Anexión, por su consejo y crítica en la elaboración del manuscrito.

ABSTRACT

The repressive mechanism of the Lamda phage during lysogenia is reviewed. The polypeptidic repressor Ls characterized, and it is noted that its active presence is needed for the expression of the regulating gene that controls protein synthesis from the coliphage's DNA.

BIBLIOGRAFIA

1. Burrows, W. *Textbook of Microbiology* (19 ed), Vol. 1. W. B, Saunders Comp. 86—99, 1969.
2. Chadwick, P. and Pirrotta, V. The Lamda and 434 phage repressors. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35:325—330, 1970.
3. Changeux, J. P. The control of biochemical reactions. *Scient. Amer.* 35:40—43, 1966.
4. Cohen, N. R. The control of protein biosynthesis. *Biol. Rev.* 41:503- 556. 1966.
5. Davidson, J. N. *The biochemistry of nucleic acids.* (6 ed.) Mathuen and Cols., Inc 303--309. 1969.
6. Hayes, W. *The genetics of Bacteria and their Viruses.* (2 ed.) John Wiley and Sons Inc. 534-573, 1965.
7. Herskowitz, I and Rossman, M. G. Control of transcription from Rstrand of phage Lamda. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35:355—367, 1970.
8. Jacob, F. and Monod, J. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins (a) *J. Mol. Biol* 3:318—356, 1961.
9. Jacob, F. and Monod, J. On the regulation of gene activity. (b). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26:193 -215, 1961.
10. Monod, E. Changeux. J. P. and Jacob, F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6:306- 329. 1963.
11. Monod, J. Wyman. J. and Changeux, J, P. On the role of allosteric transitions, a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12:88 -118, 1965.
12. Monod, J. From enzymes adaptation to allosteric transitions, *Science.* 154:475 —483, 1966.
13. Perutz, M. F. and Signer, E. The Hemoglobin Molecule. *Nature.* 185:416—420, 1960.
14. Pirrotta, V. Isolations of repressors. *Nature, N. Biol.* 244:13—18, 1973.
15. Ptashne, M. and Gilbert, N. Genetic repressors. *Scientific Amer.* 22; 36—44, 1970.
16. Schleif, R. and Geenblott, L. Transcription in Lamda ara-phage. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35:369- 373, 1970.
17. Spiegelman, W, and Heineman, S. Regulation of the synthesis of the phage Lamda repressor. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35:283—294, 1970.
18. Sypherd, P. and Strauss, N. The role of RNA in repression of enzyme synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50:1059-1066, 1963.