

R 457

" AISLAMIENTO DE MUTANTES DE ESCHERICHIA COLI
 K- 12 AFECTADOS EN LA EXPRESION DEL ACIDO
 RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA " .

OSCAR REYES ALVARADO



1 9 7 4

Programa de Doctorado en Ciencias.
Mención en Biología.
Programa de Bioquímica.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Chile.

C E R T I F I C A D O D E A P R O B A C I O N
D E T E S I S D E D O C T O R A D O . -

Certificamos que la Tesis de Doctorado de

OSCAR REYES ALVARADO

ha sido aprobada por el Comité Examinador,
y cumple con el requerimiento de Tesis e-
xigido para el grado de Doctor en Ciencias
con mención en Biología.

Santiago, de de 1974

Comité de Tesis:

.....

.....

.....

.....

.....

A MIS PADRES

A EUGENIA

A LEONORA

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo no podría haber sido realizado sin la cooperación y estímulo desinteresado de las siguientes personas:

- Los Profesores Catherine y Jorge Allende, a los cuales debo agradecer además la mayor parte de mi formación científica, y el haberme orientado hacia la Genética Molecular.
- Alain Ghysen, al cual debo agradecer además su amistad y buena parte de mi formación como genetista.
- Raúl Goldschmidt, al cual debo además su invaluable influencia moderadora.
- Marta Gatica, cuya generosidad nunca será lo suficientemente reconocida.
- Eugenia Jedlicki, a quién debo agradecer además sus valiosas críticas a este trabajo, y el haber confiado en sus resultados parciales más que su mismo autor.

Este trabajo fue financiado principalmente por los excedentes de un subsidio otorgado por el "Institute for International Education" a Alain Ghysen, y en parte por la Organización de Estados

Americanos y la Comisión de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

El autor es titular de una Beca de Perfeccionamiento Básico-Clínico otorgado por la Facultad de Medicina (Sede Norte) de la Universidad de Chile.

" AISLAMIENTO DE MUTANTES DE ESCHERICHIA
COLI AFECTADOS EN LA EXPRESION DEL ACI-
DO RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA "

Por

OSCAR REYES ALVARADO

Resumen

De una tesis presentada para cumplir con parte de los requisitos del Grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología otorgado por el Programa de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

1 9 7 4

R E S U M E N

Se desarrollaron procedimientos selectivos para obtener mutantes en los cuales estuviera aumentada o disminuída la eficiencia con que el tRNA supresor Sup F⁻ (t RNA Tyr) corrige mutaciones de terminación en fagos y bacterias.

Un grupo de estos mutantes, no afectados en el tRNA supresor, es capaz de modificar la expresión fenotípica de sup F⁻, algunos de sus mutantes y la de otros t RNA supresores. Se discute la posibilidad de que este tipo de mutantes tenga mutaciones en la vía de síntesis de proteínas.

Entre los derivados afectados en el t RNA supresor, un grupo de mutantes revierte con alta frecuencia al fenotipo sup F⁻. Esta frecuencia es superior en 40 a 3.000 veces a la de aparición espontánea del fenotipo sup F⁻. Uno de estos derivados revierte a un fenotipo similar a sup F⁻, pero distinto. La mitad de los revertantes tienen además la capacidad no seleccionada de restringir algunas líneas del fago Phi 80. Esta restricción no parece relacionada con mecanismos de "modificación y restricción" ni con resistencia de membrana. Estos resultados no pueden ser explicados en base a los mecanismos conocidos de mutación y reversión.

A B S T R A C T

Selective procedures were developed to obtain mutants with diminished or increased suppression efficiency of suppressor tRNA sup F⁻ (t RNA Tyr I) or his derivatives toward "nonsense" mutations of bacteria and phage.

A group of the obtained mutants, not affected on suppressor itself, were able to modify phenotypic expression of sup F⁻, derivatives of it and other suppressors tRNA's. The possibility that these mutants have defects on protein synthesis pathway is discussed.

Among derivatives affected on suppressor t RNA, a group of mutants revert to sup F⁻ phenotype with high frequencies (ranging from 40 to 3.000 times the spontaneous rate of aparition of this phenotype). One of the above derivatives revert to a similar phenotype, but distinct to sup F⁻. In a half of this revertants appear the non selected ability to restrict some lines of phage Phi 80. This restriction is apparently not related with "host-controlled variation" nor membrane resistance. The above results cannot be explained in the basis of know mechanisms of mutation and reversion.

" AISLAMIENTO DE MUTANTES DE ESCHERICHIA
COLI K- 12 AFECTADOS EN LA EXPRESION
DEL ACIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA"

Por

OSCAR REYES ALVARADO

Tesis

Presentada para cumplir con parte de los
requisitos del Grado de Doctor en Ciencias
con mención en Biología, otorgado por el
Programa de Bioquímica de la Facultad de
Ciencias de la Universidad de Chile.

1 9 7 4

I N D I C E

MATERIAS

TABLAS

FIGURAS

INDICE DE MATERIAS

<u>MATERIA</u>	<u>PAGINA</u>
<u>Introducción. Capítulo 1</u>	1
1.- Aspectos generales del estudio de las vías metabólicas	1
2.- La síntesis de proteínas considerada como una vía metabólica	3
3.- Supresores de Terminación y concepto de situación supresional	5
4.- Utilización del concepto de "situación supresional" en la búsqueda de mutantes afectados en la síntesis de proteínas.	9
5.- Generalidades del sistema experimental usado	11
6.-a) Técnicas: Espectro de supresión.	12
6.-b) Técnicas: Contra selección y selección de supresores	16
<u>Resultados. Capítulo 2.-</u>	18
Selección por mejoramiento de situación supresional.	

Construcción de cepas en baja situación supresional.	18
1.- Selección por mejoramiento de <u>si</u> tuación supresional de los fagos transductores de supresor de UAA.	20
2.- Selección de mejor situación supresional en la cepa SC 200 (Phi 80 p sup F- U80, U35 UAG 2).	24
3.- Caracterización de las clases II, III, y IV de prototrofos para leucina.	26
4.- Caracterización de sex A y sex B.	30
5.- Discusión	32
<u>Resultados. Capítulo 3.-</u>	37
Selección por decremento de situación supresional.	
1.- Teoría y Práctica del sistema selectivo.	37
2.- Aislamiento y Clasificación de derivados termorresistentes.	38
3.- Caracterización de clases B y C.	41
4.- Búsqueda de mutantes de fenotipo "sos" en clases B y C.	43
5.- Caracterización de mutantes de sup E	

6.- Análisis de la propiedad de alta frecuencia de reversión de SC 266.	51
7.- Discusión 7A) Fenotipo "sos"	55
Discusión 7B) Mutaciones de supresor.	57
<u>Conclusiones. Capítulo 4º.-</u>	65
<u>Lista de cepas. Capítulo 5º.-</u>	67
1.- Cepas Bacterianas Canónicas.	67
2.- Cepas Bacterianas construídas.	68
3.- Cepas de Bacteriófagos	71
<u>Materiales y Métodos. Capítulo 6º.-</u>	74
<u>Bibliografía.-</u>	87

INDICE DE TABLAS

<u>TABLA</u>	<u>PAGINA</u>
Tabla 1	14a
Tabla 2	14b
Tabla 3	19a
Tabla 4	20a
Tabla 5	25a
Tabla 6	25b
Tabla 7	29a
Tabla 8	31a
Tabla 9	31b
Tabla 10	33a
Tabla 11	40a
Tabla 12	41a
Tabla 13	42a
Tabla 14	45a
Tabla 15	47a
Tabla 16	48a
Tabla 17	52a
Tabla 18	53a

INDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>	<u>PAGINA</u>
Fig. 1.	3
Fig. 2.	3
Fig. 3.	10
Fig. 4.	13
Fig. 5.	17
Fig. 6.	17a
Fig. 7.	41a

CAPITULO IINTRODUCCION

"De l'incertitude profonde des desseins naît une étonnante liberté de manoeuvre"

Jean Anouilh

"Becket, Acto III."

1.- Aspectos generales del estudio de las vías metabólicas.-

El estudio de las vías metabólicas puede realizarse empleando dos metódicas alternativas: la bioquímica y la genética molecular. Ambas metódicas, al ser fundamentalmente distintas en su enfoque, proporcionan, en general, aspectos complementarios de la realidad natural. Por esta razón, aún en el caso de vías metabólicas bien caracterizadas bioquímicamente, es siempre deseable una formulación de la vía en los términos fenomenológicos propios de la genética molecular. El propósito principal de esta tesis fue caracterizar de este modo la vía de síntesis de proteínas. Los principales aspectos teóricos de este problema serán analizados en este primer capítulo.

La caracterización genética de una vía metabólica requiere, en primer término, aislar mutantes afectados en los procesos que la integran. Estos deben ser seleccionados entre millones de organismos normales respecto a estas funciones, por lo cual esta tarea requiere el diseño de técnicas de selección especiales. En algunos casos es posible dirigir la selección hacia la obtención de mutaciones en reacciones específicas de la vía metabólica. En otros casos, la selección puede ser dirigida a la obtención de organismos afectados en todas las

reacciones de la vía metabólica.

Algunos ejemplos de la modalidad de selección específica en la síntesis de proteínas son el aislamiento de mutantes resistentes a la acción de antibióticos y productos químicos que afectan funciones únicas de esta vía, como la transcripción (afectada por rifampicina) y la función ribosomal (afectada por estreptomina, espectinomicina, ácido fusídico, etc.) El principio selectivo general está representado en la síntesis proteica, principalmente por la búsqueda de mutantes termosensibles que no provoquen requerimientos nutricionales.

Las mutaciones termosensibles de este tipo pueden ser causadas por defectos en funciones vitales como replicación de DNA, síntesis de pared celular, síntesis de proteínas, etc. En consecuencia, las mutaciones en la vía de nuestro interés no son las únicas obtenibles por este método. El aspecto genético de la vía de la síntesis de proteínas ha sido revisado en la ref. 1.

El espíritu general de esta tesis es el diseño de procedimientos selectivos adecuados a la búsqueda de mutantes en los que esté afectada la interacción de los componentes de la vía de síntesis proteica con un sustrato común a todos ellos. Los métodos selectivos así concebidos combinaron las ventajas principales de los métodos selectivos específicos (dirección de la presión selectiva hacia las reacciones de la vía de interés) y de los métodos selectivos generales. (la presión selectiva se ejerce indistintamente en todas las reacciones de la vía.

En las secciones siguientes se discutirá más detalladamente el diseño de métodos selectivos de la naturaleza indicada.

2.- La síntesis de proteínas considerada como una vía metabólica.-

La transferencia de información en la síntesis proteica se esquematiza generalmente como en la figura 1.- (2)

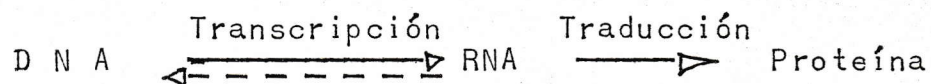


Fig. 1.-

Para nuestros propósitos, la traducción, o uso de la información contenida en el mRNA para sintetizar proteínas, será analizada como una vía metabólica cuyo eficiente funcionamiento depende de la especificidad de la interacción de sus elementos componentes con un ácido nucleico.

El proceso de traducción puede descomponerse en tres etapas principales:

- a) iniciación de la cadena polipeptídica,
- b) elongación, y
- c) terminación de ésta.

Para nuestro análisis son relevantes las dos últimas etapas. Estas pueden disponerse como se indica en la figura 2.-

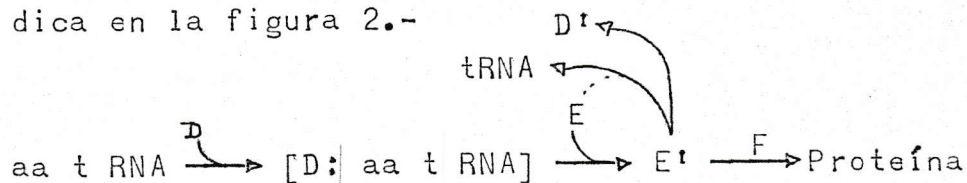


Figura Nº 2.-

En la figura 2, D representa el complejo binario Tu · GTP y D¹ el complejo binario Tu GTP · E representa el complejo [Ribosoma: mRNA: peptidil t RNA]. El paso de E a E¹ simboliza la

elongación del peptidil tRNA en un aminoácido, proceso que se repite cíclicamente, hasta que el complejo de tipo "E" encuentra en el m RNA una señal de terminación y de la traducción, ya sea ésta natural o anormal. En este momento, actúan las funciones de terminación (simbolizadas con la letra F en la figura 2) liberando el péptido del peptidil t RNA .

En la figura 2 es posible considerar la biosíntesis proteica como una secuencia de reacciones que utiliza aminoacil tRNA como principal sustrato, y cuyos productos netos son proteína y tRNA deacilado. La maquinaria biosintética no cumple una labor esencialmente diferente de la de las enzimas y cofactores de una vía metabólica corriente.

Aunque el aminoácido es la única parte del aminoacil t RNA que se incorpora en las proteínas, la información que permite que éste se ubique frente a su triplete característico reside en la porción t RNA de la molécula. La única reacción de la biosíntesis de proteínas en que la naturaleza de la cadena lateral aminoacídica tiene importancia es la de formación del aminoacil-t-RNA mismo. Esta reacción, que asegura la especificidad del proceso total; produce un sustrato, el aminoacil-t RNA, en el cual la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido no participa en la especificidad de los pasos siguientes, como se desprende de la eficiencia con que se incorporan en proteína aminoácidos unidos a un t RNA no homólogo. (3,4,5, 6,7).

El problema de obtener mutantes afectados en los elementos D y E de la vía, o en eventuales elementos regulatorios, se reduce a definir condiciones de crecimiento en que se necesite

mayor o menor cantidad del producto final de la vía, o sea, proteína. En estas condiciones se podrían seleccionar variantes que hayan, respectivamente, mejorado o disminuído la eficiencia con que algunos de los elementos de la vía interactúa con t RNA. La clave de la solución de este problema la dan los "supresores" de mutaciones de terminación.

3.- Supresores de mutaciones de terminación y concepto de "situación supresional".-

En genética se llama corrientemente "supresora" a una mutación que restaura total o parcialmente la actividad de un gen ya inactivado por una mutación previa, y que aparece en un sitio distinto de ésta. Los supresores de mutaciones de terminación, o más simplemente "supresores", son un caso particular de este tipo general de mutaciones. A continuación explicaré los rasgos generales de su mecanismo de acción.

El código genético contiene tres tripletes llamados "sin sentido", los cuales no codifican aminoácidos alguno. Estos son UAG, UAA y UGA, denominados corrientemente "ámbar", "ocre" y "ópalo" respectivamente. Cuando un triplete codificador se transforma, por mutación, en uno sin sentido, el mensajero del gen mutado se traduce sólo hasta el triplete sin sentido, pues la maquinaria biosintética encargada de la traducción carece normalmente de t RNA complementario a dichos tripletes. La consecuencia es la formación de un péptido mas corto que el normalmente sintetizado por el gen, y por ello, generalmente no funcional. Por esta causa, las mutaciones a tripletes "sin sentido" se llaman también "mutaciones de terminación".

La reversión fenotípica* de estas mutaciones puede deberse a una segunda mutación en el gen originalmente mutado, o bien un gen distinto. Las mutaciones de este último tipo se llaman "supresoras" y tienen generalmente, como mecanismo de acción, la transformación del anticodón de un t RNA en otro que es complementario al triplete "sin sentido". La existencia de este t RNA modificado permite la síntesis de un péptido de longitud normal y la restauración total o parcial de la actividad del producto génico.

El grado de la restauración de esta actividad, parece depender de los siguientes factores:

a) El tipo de aminoácido que cargue el t RNA supresor. La actividad específica de la proteína corregida por el t RNA supresor debe depender de la adecuación del aminoácido introducido a los requerimientos estructurales y funcionales de la proteína.

b) Actividad y especificidad de Aminoacil-t RNA ligasa. El anticodón cambiado del t RNA supresor puede modificar la especificidad de la acción de las ligasas sobre éste. (4, ver nota). Por otra parte, las mutaciones que modifiquen la especificidad y actividad de la ligasa homóloga al tRNA supresor pueden alterar la disponibilidad de la forma aminoacilada de éste para la síntesis proteica.

* : Se llama "fenotipo" a toda propiedad del organismo en estudio que es observable en condiciones operacionales definidas. El concepto complementario de "genotipo" se refiere a las características del locus génico responsable del fenotipo. En general, un mismo fenotipo puede estar determinado por más de un genotipo distinto.

c) El nivel celular de t RNA supresor. La mayoría de los supresores conocidos son mutantes de especies de t RNA que se presentan normalmente en baja cantidad (relativamente a la actividad total aceptora del aminoácido correspondiente). Por ello, el nivel de t RNA supresor parece ser en algunos casos un factor limitante en el nivel de proteína corregida producida por el gen mutante (6)/

d) Influencia del ribosoma en la actividad intrínseca del anticodón del t RNA supresor. Posiblemente existen mecanismos por medio de los cuales la maquinaria biosintetizante de proteínas puede discriminar entre tRNA cuya única diferencia es una base del anticodón. Por ejemplo, el cambio del anticodón de UAG (supresor de "ámbar") al anticodón de UAA (supresor de "ocre") disminuye drásticamente la actividad de supresión del t RNA (8,9) esta tesis). Por otra parte, el hallazgo de que el t RNA supresor de UGA está mutado en un sitio fuera de la región del anticodón (10,11) es una buena evidencia de que la determinación de parte de la especificidad del apareo entre codón y anticodón depende de factores ajenos a las reglas de Watson y Crick. Estos factores son probablemente ribosomales (12).

e) Contexto del mensaje genético. Parece existir un efecto del "entorno" del triplete de terminación en la eficiencia con que t RNAs determinados corrigen estas mutaciones (13).

f) Factores celulares relacionados con la supresión. Se han descrito efectos en la eficiencia con que actúan algunos supresores, produci-

-dos por mutaciones en elementos del ribosoma (14, 15, 16, 17) o en otros no especificados (18, esta tesis). Los elementos celulares que tienen potencialmente la capacidad de modificar la actividad de los t RNA supresores incluyen, además de los ribosomales, el factor Tu y los factores de terminación. Posiblemente en el mecanismo de supresión por t RNA existe una competencia, a nivel del triplete de terminación, entre el t RNA supresor y el mecanismo normal de terminación.

Por las anteriores consideraciones, el crecimiento de una célula en condiciones que se requiera supresión de una mutación de terminación dependerá, en cada caso particular considerado, de la naturaleza de las dos mutaciones en juego, la mutación supresible y la supresora. Así, una mutación de terminación que es bien suprimida al estar en presencia de un supresor adecuado, puede ser mal suprimida (o no suprimida del todo) al ser colocada frente a un supresor no adecuado (6, 19, esta tesis). Este último a su vez, puede mostrarse como un supresor eficiente frente a una nueva mutación de terminación. Por otra parte, la interacción descrita puede ser modulada por factores celulares que incidan en la supresión. La interacción del trío de factores "mutación supresible-supresor-factor-celular" determinan, en el organismo considerado, una situación única para cada elección de éste. En lo sucesivo me referiré a esta situación como "situación supresional". Operacionalmente es posible distinguir tres situaciones supresionales. Una "buena situación supresional" caracterizada por un buen crecimiento del organismo en condiciones que requieran supresión; una "mala situación supresional", ca-

-racterizada por ausencia de crecimiento en estas condiciones, y finalmente una o varias situaciones intermedias. La discriminación entre diferentes situaciones supresionales puede ser ampliada, como se verá en la sección 5.

4.- Utilización del concepto de "situación supresional" en la búsqueda de mutantes afectados en la síntesis de Proteínas.-

Como hemos visto en la sección 2, el problema de encontrar mutantes en la vía de síntesis de proteínas queda reducido a definir condiciones de crecimiento celular en que se necesite más o menos cantidad de alguna proteína. Esto se puede lograr escogiendo una proteína cuyo gen esté afectado por una mutación de terminación y regulando su supresión escogiendo supresores adecuados. En otras palabras, manipulando adecuadamente los factores "t RNA supresor", y "mutación supresible" que determinan la situación supresional, debe ser posible determinar una mala (o buena) situación supresional en el organismo considerado. De ahí debe ser posible derivar situaciones supresionales mejoradas (o malas) a través de nuevas mutaciones en los factores "t RNA supresor", "mutación supresible" u los "factores celulares" (no considerados en la determinación de la situación supresional original). Por supuesto, teóricamente es posible escoger cualquier combinación posible del trío en la manipulación que conducirá a la determinación de la situación supresional que servirá de partida al procedimiento selectivo.

Sin embargo, el enfoque anterior obliga a incluir dentro de los blancos mutacionales posibles del sistema de selección a los elementos

de la vía de síntesis del t RNA supresor usando para definir la situación supresional así, el blanco total del procedimiento de selección expuesto es la vía que va desde la transcripción del tRNA hasta su utilización (Fig. 3), incluyendo el gen que produce el t RNA.

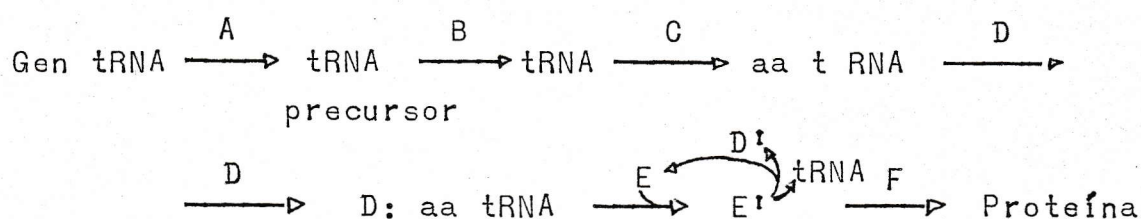


Fig. 3.-

En la Fig. 5, A, B y C representan, respectivamente los pasos de transcripción, maduración y aminoacilación del t RNA. Los elementos D, D', "E" y F ya se definieron en la sección 2.

En esta tesis se exploraron las dos alternativas posibles en el procedimiento de selección ya expuesto. La selección por mejoramiento de situación supresional, que será discutida en el Capítulo I, se efectuó buscando revertantes prototrofos en una cepa con una mutación auxotrófica suprimible, y un mal supresor de dicha mutación. La selección por decremento de situación supresional, que se discutirá en el Capítulo III, consistió en buscar variantes celulares que restringieran el desarrollo de un fago con mutaciones supresibles, a partir de una célula con un buen supresor de las mutaciones de dicho fago.

¿Qué tipos de mutaciones podemos espe

-rar aislar usando estos procedimientos de selección? Principalmente mutantes en a) elementos regulatorios y estructurales del gen de tRNA (etapa A); B) en las funciones determinantes de la especificidad de reconocimiento de tRNA de los elementos B,C,D,E y F. c) en las funciones determinantes de las características cinéticas de interacción con tRNA de los elementos B,C,D,E y F.

5.- Generalidades del sistema experimental usado.-

A) tRNA Supresor.- Como tRNA supresor se usó el alelo sup. F del gen sup F, llamado corrientemente Su⁺ III, Su⁺ 3 o sup. 3. Este corresponde a la especie isoaceptora menor del tRNA tyr, el tRNA tyr I con una mutación en el anticodón que lo hace complementario al triplete UAG (20). Las razones que justifican esta elección residen en el amplio estudio genético y bioquímico de que ha sido objeto esta región genética cuyos principales resultados describiré a continuación.

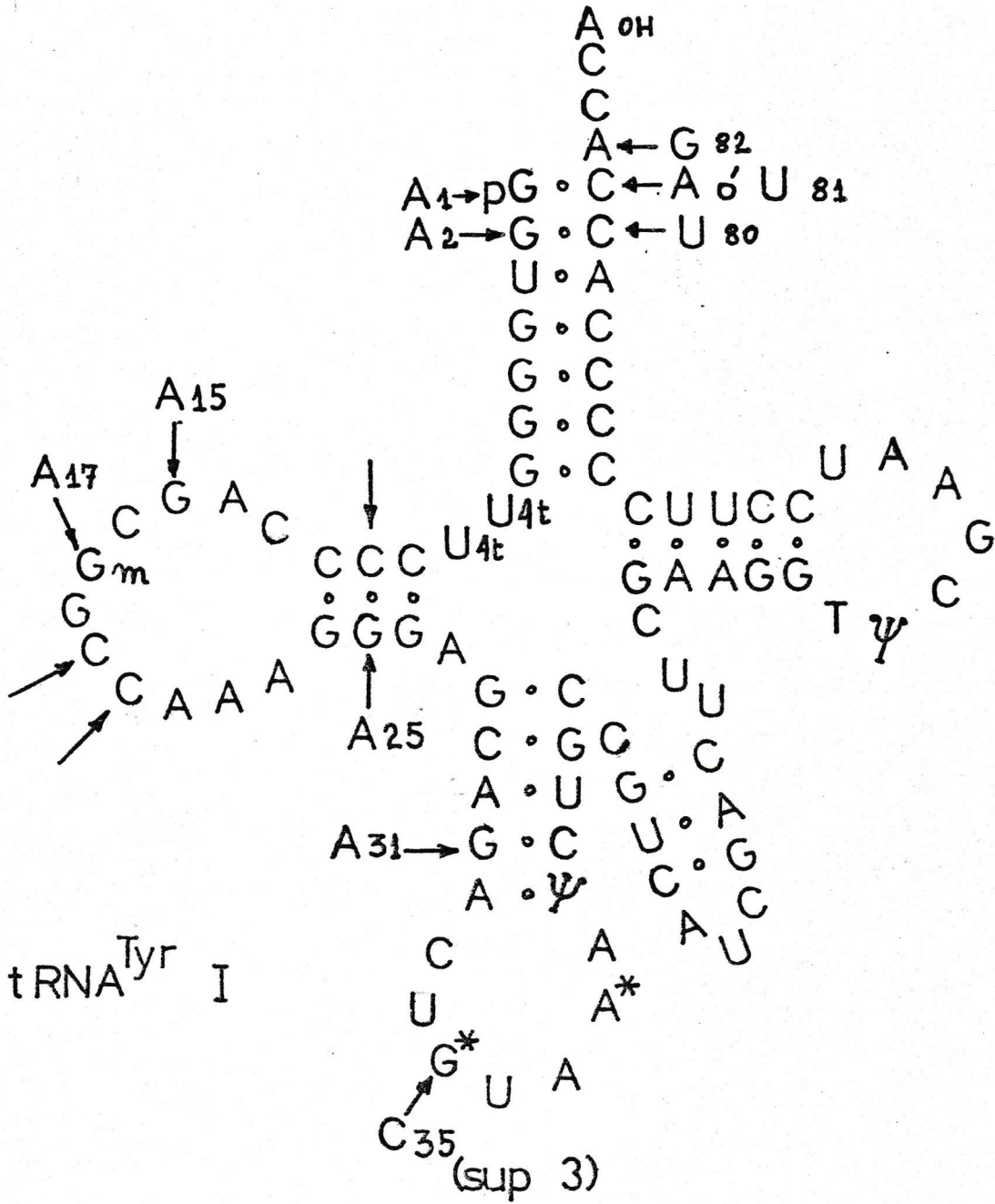
La región sup F. contiene dos copias funcionales y aparentemente idénticas del gen que codifica la estructura madura del tRNA tyr I. (6,20). Este gen se transcribe en forma de un RNA precursor (21) probablemente común a los dos genes (22). El alelo de sup F usado a lo largo del trabajo (23), tiene la mutación que dá el carácter supresor en el anticodón del primero de los genes repetidos del tRNA tyr I, contando en el sentido de la transcripción (22,24). La unidad transcripcional definida por el precursos común a los dos genes de tRNA posee probablemente por lo menos tres puntos de iniciación de transcripción (25).

En el sistema sup F se han aislado numerosas mutaciones que afectan la actividad de este tRNA. Mencionaré especialmente las mutaciones A 15 y A 31. (26, fig. 4). La nomenclatura para las mutaciones de tRNA indica la base que está cambiada en el mutante, y la posición donde ha ocurrido el cambio, contando desde el extremo 5' de la secuencia del tRNA maduro). Estas afectan respectivamente, las etapas subsecuentes a la unión con el ribosoma, y la Km. por la Tirosil-tRNA ligasa. Además, se han estudiado sistemáticamente las mutaciones relacionadas con la especificidad y el sitio de reconocimiento de las aminoacil-tRNA ligasas (4,5,6, 7,26,27), todas ubicadas en el brazo aceptor del tRNA (Fig. 4). También se han aislado mutantes en el anticodón del tRNA tyr, que lo hacen supresor del codon UAA (28, esta tesis). Las mutaciones anteriormente descritas han sido aisladas aplicando conceptos selectivos básicamente idénticos a los planteados en las secciones anteriores. Sin embargo, las técnicas analíticas usadas estaban diseñadas en general, de modo de detectar solamente los mutantes en el tRNA.

6.- Técnicas.-

a) Espectro de supresión:

Como ya se señaló al final de la sección 3, en cada combinación de los tres elementos que determinan la situación supresional (supresor, mutación, supresible y factores celulares) sólo es posible distinguir tres grados de la situación supresional: buena, mala e intermedia. El rango de discriminación



puede ser ampliado inspeccionando el efecto de cada pareja "factores celulares-supresor" en distintas mutaciones supresibles. El espectro de situaciones supresionales resultante caracterizará en forma única cada pareja "factores celulares-supresor" si las mutaciones supresibles son adecuadas, y se prueba un número grande de ellas. Una forma fácil de hacer esto es examinar el crecimiento de distintos mutantes de terminación en fagos sobre la cepa probada. Esta técnica, conocida usualmente como "espectro de supresión", permite distinguir inequívocamente entre los distintos tRNA supresores, muchos de los mutantes de un mismo supresor y nuevos supresores (6, 19, 29 y 30, esta tesis). Las tablas 1 y 2 presentan respectivamente los espectros de supresión de mutantes UAG del fago lambda por algunos de los supresores conocidos de UAG y UAA, y las características principales de éstos. La Tabla 1 nos muestra que el patrón de crecimiento de fagos es único para cada cepa supresora considerada. Este patrón único puede ser correlacionado con la "eficiencia de supresión" del supresor. Este parámetro se define operacionalmente como el cociente entre la producción (dependiente de supresor) de cadenas polipéptidicas en un gen con una mutación de terminación, y tal producción medida en el gen no mutante.

Así, los mutantes de lambda 203, 7 y 8 permiten ordenar a los supresores en dos grupos, al crecer en los supresores de UAG sup D, sup E, sup F y Su^+ 6 (de eficiencias de supresión entre 20 y 50%), y no crecer en los supresores de UAA y UAG sup C, sup G y

T A B L A N o 1

SUP	MUTANTES U.A.G. DE FAGO LAMBDA										MUTACIONES BACTERIANAS		MUTACIONES BACTERIANAS		
	λ	207	3	227	5	57	43	216	221	203	213	7	8	lac	UAA arg
sup D	+	<u>±</u>	+	-	+	-	-	-	-	<u>±</u>	+	+	+	-	-
sup E	+	<u>±</u>	+	-	+	-	<u>±</u>	+	+	<u>±</u>	+	+	+	-	-
sup F	+	<u>±</u>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
sup G	+	<u>±</u>	-	<u>±</u>	+	<u>±</u>	-	-	-	-	+	-	-	+	<u>±</u>
su +6	+	<u>±</u>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
sup V	+	+	+	+	+	<u>±</u>	+	+	+	+	+	+	+	np	+
sup B	+	<u>±</u>	p	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+

TABLA 1.- Los supresores ensayados, excepto sup V son derivados espontáneos de SC 180 (selección arg⁺) caracterizados comparando su espectro con el de las cepas de la serie SC 54 sup X. Sup V está en la cepa LSS 446 (n p= no probado) (ver descripción de cepas y métodos usados en sección apéndice).

T A B L A Nº 2

NOMBRE SISTEMÁTICO	NOMBRES CORRIENTES	CODONES SUPRIMIDOS	AMINOACIDO INTRODUCIDO
Sup D	Su ⁺ 1; Su ⁺ I	UAG	serina
Sup E	Su ⁺ 2; Su ⁺ II	UAG	glutamina
Sup F	Su ⁺ 3; Su ⁺ III; sup 3; Y-meI	UAG	tirosina
Sup C	Su ⁺ 4; Su ⁺ C	UAG, UAA	tirosina
Sup G	Su ⁺ 5	UAG, UAA	Iisina
---	Su ⁺ 6	UAG	Ieucina
Sup V	Su ⁺ 7;	UAG	glutamina
Sup B	Su ⁺ B	UAG, UAA	glutamina

TABLA Nº 2.- Datos tomados de referencia 32.

sup B. (de eficiencias de supresión entre 1 y 5%). Los mutantes de lambda 207, 213 y 5 crecen en todos los supresores de las Tablas 1 y 2, (excepto 5 en sup G) hecho que permite considerar a estos mutantes como un buen criterio operacional de la presencia de supresores en una cepa. El crecimiento de los mutantes 3, 227, 57, 221, 43 y 216 puede ser correlacionado con el aminoácido introducido por el supresor. Así, los mutantes 57 y 227 parecen crecer casi únicamente en supresores que introducen tirosina. (La excepción es am 227, que puede ser corregido también por Su⁺ 6, que introduce leucina. El caso de sup V se discutirá más adelante). Los mutantes 43, 216, 221 y 3 parecen ser corregidos principalmente por supresores que introducen glutamina, es decir, sup E, sup V y sup B. (Las excepciones son sup B, el cual no corrige a 43 probablemente por la baja eficiencia de supresión que parece inherente a los supresores de UAA, y sup D, que corrige bien a 3).

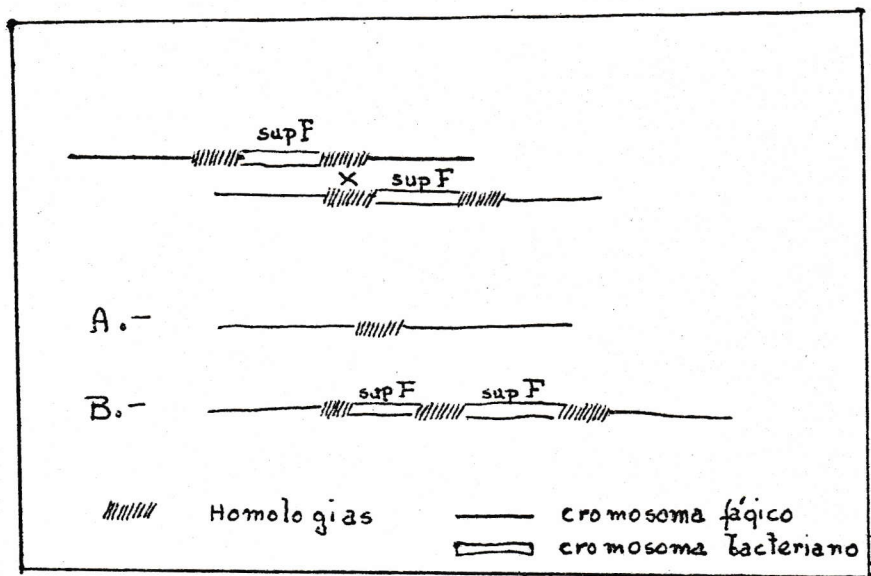
El tipo de correlaciones indicado ha demostrado ser de gran valor predictivo en el establecimiento del aminoácido introducido por los mutantes de sup F de "carga equivocada" (6, 24). Sin embargo, estas correlaciones deben establecerse con cautela, debido al insuficiente conocimiento de los factores que determinan la situación supresional. Por ejemplo, es difícil correlacionar la capacidad de sup V de corregir a 227 y 57 con la propiedad de éste de cargar glutamina. Sin embargo, debo hacer notar que sup V es un supresor fundamentalmente distinto a los otros presentados en las tablas 1 y 2.

En primer lugar, proviene de la mutación en el anticodón de una especie isoacceptora mayor de tRNA, lo cual lo hace fisiológicamente diferente a los otros supresores de las tablas 1 y 2 (35), que seguramente provienen de especies isoacceptoras menores de tRNA. En segundo lugar, el alelo no mutante de sup V es un tRNA que carga triptofano (4, ver "note added in proof"); y la mutación que le da el carácter supresor influye también en su especificidad de carga, haciéndolo cargar glutamina. Así, posiblemente su capacidad de corregir a los mutantes 227 y 57 de lambda podría atribuirse a la capacidad del tRNA sup V de cargar, erróneamente, también algo de tirosina.

b) Contraselección y selección de supresores.

La mayor parte de la evidencia bioquímica y genética existente acerca de la región sup F proviene del estudio de derivados del fago Phi 80 que llevan esta región genética en su cromosoma (20, 31). A lo largo de esta tesis se hizo uso de uno de estos fagos transductores (31) el cual posee, además de la región sup F, todos los genes necesarios para su crecimiento vegetativo y establecimiento de lisogenia, por lo cual es particularmente adecuado para el trabajo genético. Este fago tiene el inconveniente de llevar la región sup F entre dos zonas homólogas del cromosoma fágico, hecho que puede dar lugar a fenómenos que complican la interpretación de resultados. Por ejemplo, la selección por mejoramiento de situación supresional en lisógenos para estos fagos puede dar origen a derivados en que la región sup F se duplica o triplica ("amplificación"), por recombinación entre las regiones homólogas que codean la región bacteriana del fago. (6, y ver recombinante A en figura 5).

FIG. Nº5.-



Igualmente, la selección por disminución de situación supresional puede dar origen a fagos que han perdido la región sup F (debido al evento recíproco de recombinación señalado con B en la figura 5 y la producción de la estructura C en la figura 6). Este tipo de comportamiento es característico de las duplicaciones, y de hecho, parece afectar también en forma análoga el comportamiento de la región sup F en el cromosoma bacteriano, frente al tipo de selección indicado. Como ya se ha visto, la región sup F normal tiene dos copias del gen estructural del tRNA^{Tyr} 1. (20,31). Los fenómenos recíprocos de excisión y amplificación recombinacional son cerca de 100 veces más frecuentes en lisógenos para el fago transductor que en la bacteria debido probablemente al mayor tamaño de la región de homología existente en el fago. Las propiedades anteriormente descritas deberán ser tenidas en cuenta permanentemente en la construcción, análisis e interpretación de los sistemas selectivos.

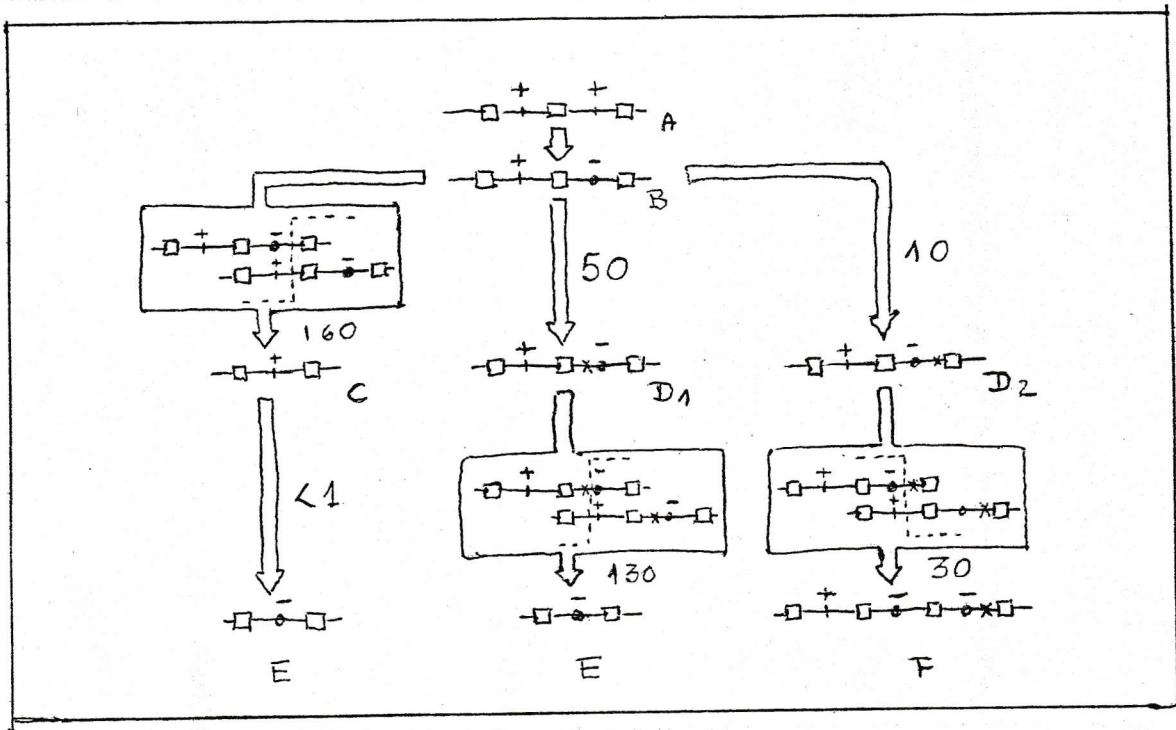


FIGURA Nº 6.- Adaptada de la Referencia 20. Los números en las flechas indican la frecuencia del proceso indicado, en unidades de 10⁻⁸. Los alelos denominados B, E y F son fenotípicamente supresores. El signo (+) designa la forma silvestre del tRNA tyr I. El signo (-), designa el alelo mutante sup F.

CAPITULO IIR E S U L T A D O SSELECCION POR MEJORAMIENTO DE SITUACION SUPRESIONAL1.- Construcción de cepas en baja situación supresional.-

La estrategia adoptada en este problema fue:

- a) escoger una combinación de mutaciones que determinaran una buena situación supresional y
- b) modificar el tRNA supresor de UAG usado a través de su transformación en un supresor de UAA de modo de obtener la mala situación supresional que serviría de punto de partida al procedimiento de selección. Esta estrategia garantiza que el sistema usado tiene la posibilidad de mejorar su situación supresional.

Con este fin, se mutagenizó con N, N^o metil nitroso guanidina al fago Phi 80 p sup F;UAG 2 (31) y sus derivados sup F - U80 , sup F - G 82 y sup F - A1, U81 (6). Con los cultivos mutagenizados se infectó a SC 180 (la cual posee una mutación lac UAA, es decir una mutación de terminación UAA en la enzima B-galactosidasa), a multiplicidad de infección menor que 0.1 fagos por bacteria (con el fin de evitar las complicaciones que surgirían de la formación de lisógenos múltiples). Se seleccionaron derivados lac⁺ entre las células infectadas, y en estos, después de purificados, se indujo el fago lisogénico. Los lisados resultantes se usaron para reinfectar a baja multiplicidad a SC 180, nuevamente seleccionando los lisógenos 8ac⁺. En estos, después de purificados, se determinó el espectro de supresión. En forma análoga se infectó a SC 175 (se-

-leccionando por la corrección de su mutación tyr UAA)y a SC 200 (seleccionando por la supresión de su mutación arg E 21 UAG). En SC 20 se ensayó la capacidad de los supresores lleva dos en el fago para corregir su mutación len UAG. En SC 180 se ensayó la corrección de arg E21 UAG. La Tabla 3 resume los resultados obtenidos.

Los datos presentados en la Tabla 3, muestran que la versión supresora de UAA de sup F es indistinguible de sup C, también un supresor de UAA que carga tirosina. El supresor de UAA derivado de sup F - G 82 (el que carga glutamina "in vivo", 6) sólo puede distinguirse de sup B (que también carga glutamina) en base a la corrección de la mutación bacteriana len UAG. En los cuatro casos estudiados, el supresor de UAA obtenido se caracteriza por ser incapaz de corregir las mutaciones 7 y 8 de lambda, hecho que, como se vió en la sección 6a del Capítulo 1, está correlacionado con una baja eficiencia de supresión. Además, el patrón de crecimiento de los otros mutantes de fago está también alterado de forma consistente con la idea de que los supresores de UAA derivados son menos eficientes que sus equivalentes de UAG. La drástica disminución de la eficiencia de supresión al transformar el anticodón de UAG en el anticodón de UAA parece ser una característica general de este proceso (8,9).

Los supresores de UAA derivados de sup F y sus mutantes seguramente surgen por cambio de la base C 35 (que da el carácter de supresor de UAG al tRNA^{Tyr} I) a U. Este cambio debe teóricamente dar un supresor de UAA y UAG*, y ha sido de-

* En esta sección, y en las siguientes, llamaremos "supresor de UAG" a aquél que suprime solamente el codón UAG, y "supresor de UAA" a aquél que suprime los codones UAA y UAG.

SUPRESORES DE UAA OBTENIDOS DE 80 p SUP F, UAG 2 Y DERIVADOS

SUPRESORES	λ	MUTACIONES UAG DEL FAGO LAMBDA				MUTACIONES DE BACTERIAS									
		3	227	5	57	43	216	221	203	213	7	8	tyrUAA	lacUAA	leuUAG
sup F	+	±	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
sup F,U35	+	±	±	+	±	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
sup C	+	±	±	+	±	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
sup F-U 80	+	±	+	+	±	-	±	+	+	+	+	-	-	+	+
sup F-U80,U35	+	±	-	+	-	-	±	-	±	±	-	+	+	-	+
sup F-G 82	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
sup F-G82,U35	+	±	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
sup B	+	±	-	+	-	+	+	-	+	+	-	np	+	-	+
sup F-A1,U81	+	±	+	+	±	-	+	+	+	+	+	-	-	np	+
sup F-A1,U81U35	+	±	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+

TABLE N° 3. El espectro de supresión de mutaciones ambas del fago lambda se estableció en el supresor introducido en SC 180.

La supresión de mutaciones bacterianas se probó en las cepas SC 176 (tyr UAA) SC 180 (lac UAA) y SC 200 (leu UAG), seleccionando la entrada del supresor cuando era necesario, por la supresión de arg UAA, presente en las cepas antedichas. (np = no probado). Los supresores sup C y sup B se presentan con propósitos de favorecer la comparación. Estos se transdujeron desde SC 54C y SC 54B, por fago PIKc. (Ver descripción de cepas y métodos en la sección pertinente del "apendice").

-mostrado directamente en un caso totalmente análogo al aquí presentado (28).

Por consiguiente, se atribuirá a dicho genotipo la actividad de supresor de UAA presentada por los mutantes anteriormente discutidos. En los tres mutantes que se estudiaron en ese sentido, la actividad supresora de UAA puede ser atribuída a un único evento mutacional, en consideración a los criterios siguientes: a) La frecuencia de aparición espontánea (sin mutagenizar) de fagos con supresores fenotípicamente idénticos a sup F - U35, sup F - U 80, U35 y sup F - G 82, U 35 es cercana a 10^{-8} supresores de UAA por fago supresor de UAG.

b) sup F - U35 y sup F-U80,U35 pueden revertir con elevada frecuencia a supresores de UAG indistinguibles del original, lo que puede demostrarse usando procedimientos selectivos adecuados, como se verá en las secciones siguientes.

2.- Selección por mejoramiento de situación supresional en los fagos transductores de supresor de UAA.-

Las tres primeras filas de la Tabla 4 muestran que los fagos transductores de supresores de UAA se multiplican mal en células sin supresor. Este hecho sugiere que la mutación UAG 2 del fago, y el supresor de UAA determinan conjuntamente una mala situación supresional.

El análisis de la tabla 3 muestra que las mutaciones leu UAG y sup F, U80, U35 definen también una mala situación supresional, si se utiliza la primera de éstas como punto de partida para seleccionar derivados con una situación supresional mejorada, una interesante situación en que la presión selectiva se ejerce sólo sobre el gen de tRNA

TITULOS DE LISADOS OBTENIDOS POR INDUCCION DE LISOGENOS PARA FAGOS TRANSDUCTORES DE SUPRESORES DE UAA

SUPRESOR	TITULO EN FORMACION DE PLACAS		TITULO EN TRANSDUCTANTES		
	SC 180	SC 180 sup F	SC 175 (Ieu ⁺)	SC 176 (tyr ⁺)	SC 180 (Iac ⁺)
sup F ocre	$4,7 \times 10^2$	$3,6 \times 10^6$	5×10^2	2×10^6	8×10^5
sup F-682 ocre	$2,0 \times 10^2$	$2,7 \times 10^8$	2×10^8	1×10^8	2×10^8
sup F-U80 ocre	$1,9 \times 10^2$	$1,0 \times 10^7$	10^{-2}	1×10^7	1×10^7
sup F-U80 w ocre	4×10^8	4×10^8	10^{-2}	4×10^8	4×10^8

TABLA N^o 4.- Los lisados se obtuvieron por inducción de los lisógenos en SC 180. Los títulos (fagos por ml de lisado), expresados con una cifra significativa fueron determinados en forma aproximada. Entre paréntesis, la mutación por cuya supresión se efectuó en la Transducción.

supresor. Tal procedimiento selectivo podría permitir el aislamiento de mutantes del promotor del gen, o supresores fuertes derivados del alelo no mutante de sup F presente en la región bacteriana de estos fagos. La presente sección muestra los esfuerzos realizados para obtener este tipo de mutantes por medio de procedimientos selectivos que emplean como base las propiedades supresionales de la mutación UAG 2 del fago por los supresores de UAA, ya sea exclusivamente o combinadas con las propiedades de len UAG.

A.- Utilización de la situación supresional de la pareja UAG 2 - sup F UAA. Todos los fagos sup F ocre capaces de formar placa en el huésped no supresor SC 180 (nueve formadores de placa provenientes del mismo lisado) recuperan la capacidad de transducir un supresor fuerte. Este es indistinguible, por espectro de supresión, del sup F originalmente presente en el fago. Sin embargo, algunos de estos fagos formadores de placa no pudieron ser separados de los transductantes de un supresor de UAA, por los procedimientos de purificación detallados en "métodos". Se estudió la posibilidad de que el nuevo supresor sup F se hubiera derivado en el gen no mutante de t RNA tyr 1 presente en la región transducida por el fago (6, 22). Para ello, se eliminó el supresor de UAA seleccionando derivados que hubieran perdido el carácter Lac +, a partir de uno de estos transductantes obtenido en SC 180, escogiendo las colonias blancas (Lac-) que aparecen en placas de EMB lactosa. Estas surgen con una frecuencia de 10^{-2} , que parece ser características de este tipo de situación selectiva. La frecuente pérdida del supresor en los derivados de Phi 80 p sup F, UAG 2 se ha atribuído (6, 31) a la eliminación, por recombinación, de la región bacteriana llevada por estos fagos, debida

posiblemente, a la posición de esta región entre zonas de homología del cromosoma fágico. Por ello, si el supresor de UAA tanto como el sup F derivado se encontrarán en la misma región bacteriana de un mismo fago, ambos debieran desaparecer con certadamente en los derivados Lac- obtenidos de la forma descrita. Este no fue el caso, pues 6/6 de las colonias Lac- probadas mantienen un supresor, de acuerdo con el fenotipo Arg + que presentaron. La dificultad mencionada de separación de los derivados formadores de placa y los supresores de UAA no han sido explicadas.

B.- Uso de la mala situación supresional de sup F-U80, U35 con UAG 2 y leu/UAG.

Debido a las observaciones anteriores, se modificó la técnica de selección de modo que la buena separación de los fagos formadores de placa fuera innecesaria. Para ello se usó como punto de partida el mutante Phi 80 p sup F-U80, U 35 ; UAG 2. En este fago es teóricamente posible distinguir, por espectro de supresión, los diferentes genotipos capaces de dar el carácter formador de placa, como se verá a continuación. Para eliminar del análisis a los formadores de placa debidos a la reversión de UAG 2 (que deben mantener el carácter sup F - U 80, U 35) se aprovechó la propiedad de leu UAG de no ser corregido por sup F - U 80, U 35.

Se examinaron por inducción en placa (ver "métodos") 99 lisógenos de SC 180 para fagos formadores de placa derivados de un mismo lisado de Phi 80 p sup F - U80, U35. La aplicación de este procedimiento permitió aislar 44 lisógenos de la cepa SC 175 (leu UAG) capaces de crecer en medio mínimo en ausencia de leucina. De estos, 16 son de

rápido crecimiento en estas condiciones, y por espectro de supresión son indistinguibles del sup F-U80, original. Estos corresponden seguramente a revertantes del anticodón UAA (28) al anticodón UAG. Los 28 lisógenos restantes crecen lentamente en medio sin leucina, y tienen un espectro de supresión similar al de sup F-U80, U35, excepto por el crecimiento del mutante UAG 7. Este fenotipo, denominado W en la TABLA 4, no ha sido ulteriormente estudiado y se atribuye, tentativamente a la formación de un lisógeno múltiple de Phi 80 p sup F U80, U35 o a duplicación de la región bacteriana del fago lisogénizante. Este último fenómeno ocurre frecuentemente (6) en este tipo de selección. Los argumentos para esta suposición son los siguientes:

- a) Los lisados obtenidos por inducción de lisógenos del fenotipo W no suprimen la mutación leu UAG de SC 175 al ser infectada esta cepa a multiplicidades bajas (menores que 10 fagos por bacteria).
- b) El supresor transducido a bajas multiplicidades de infección a SC 180 y SC 176 es indistinguible de sup F - U80, U35 por espectro de supresión. El carácter de formador de placa de los fagos inducidos de los lisógenos del fenotipo W (última fila de Tabla 4) se debe, probablemente, a la reversión de la mutación UAG 2. Ninguno de los 44 lisógenos Leu+ obtenidos tiene el espectro de supresión (sup F + sup F U80, U35); ver Tabla 10) esperado para la presencia de un fago lisogénizante de la estructura Phi 80 p sup F, sup F-U80, U35; UAG 2 teóricamente derivable por mutación del anticodón de la especie silvestre de t RNA Tyr I presente en los fagos originales (6, 22).

La mala situación supresional defini-

-da por las parejas de mutaciones [UAG 2 + sup F - U 35 y derivados] en los fagos descritos tiene poca utilidad técnica por las razones siguientes:

- a) Las dificultades de purificación de los mutantes derivados de estos fagos, ya señalada.
- b) Los artefactos derivados de la lisogenización múltiple y/o duplicación del gen supresor, ya señalados.
- c) La inestabilidad de la región supresora de estos fagos, en condiciones de crecimiento que dan buena supresión de UAG 2. Esta inestabilidad impide la obtención de lisados vegetativos con un buen título de transductantes. Sin embargo, los fagos supresores de UAA mismos proporcionan, combinados con sus versiones supresoras de UAG, una herramienta formidable en la clasificación sistemática de mutaciones de terminación.

2.- Selección de mejor situación supresional en la cepa SC 200 (Phi 80 p sup F - U80, U35; UAG 2)

Como se ha visto en la sección anterior, el supresor sup F -U80, U35 no es capaz de suprimir la mutación leu am de SC 175.

La selección por mejoramiento de situación supresional de esta pareja de mutaciones se realizó sobre la cepa SC 200, lisogénica para Phi 80 p sup F - U80, U35; UAG 2) elección de esta cepa, que posee la misma mutación leu UAG que SC 175, se debe al carácter Hfr H de SC 200, el cual facilita la labor eventual de ubicar en el mapa genético, por medio de cruces, los mutantes obtenidos.

La selección de derivados de SC 200 (Phi 80 p sup F - U80, U35; UAG 2) capaces de crecer en medio mínimo en ausencia de leucina se aplicó tanto a cultivos mutagenizados como no mutagenizados. Como control de la eficiencia de mutagenización se examinó el factor de aumento de derivados resistentes a rifampicina (20 mg/ml) en el cultivo mutagenizado con respecto a uno no mutagenizado. Este factor corrientemente fue superior a 10^3 .

Los revertantes Leu + que aparecen dentro de 60 hrs. a 37° se purifican dos veces consecutivas hasta colonias aisladas, en medio selectivo, y una vez en medio rico. En esta etapa, se determina el espectro de supresión. Los derivados Leu + obtenidos pueden clasificarse en cinco clases bien definidas. (Tabla N° 5).

Los derivados de la Clase I son incapaces de crecer en medio rico, ya sea sólido o líquido. Ya que los cultivos usados en la selección se realizan en medio rico, estos derivados deben generarse durante el procedimiento selectivo. Esta clase no ha sido estudiada ulteriormente.

Los derivados de las clases II, III, y IV se caracterizan por tener espectros de supresión distintos al del sup F- U80, U35 original. La Tabla 6 muestra estos espectros, conjuntamente con los pertenecientes a supresores conocidos. Estos se presentan para favorecer la comparación, y se escogieron por ser los más similares a los espectros característicos

DERIVADOS LEU+ DE SC 200 (80 P SUP F - U 80, U 35; UAG 2)

AGENTE MUTAGENICO UTILIZADO	NUMERO DE CULTIVOS ANALIZADO	FRECUENCIA DE DERIVADOS DE LA CLASE				
		I	II	III	IV	V
Etil		54%		12%	2%	-----
Etano	10		32%			
Sulfonato		(53/98)*	(20/28)#	(7/28) #	(2/28)#	
N,N' - metil		28%	38%	14%		20%
Nitroso	1				-----	
Guanidina		(6/21) *	(8/21)*	(3/21)*		(4/21)*
Mutación		32%		44%	4%	20%
Espontánea	3		-----			
1×10^{-8} leu+ bacteria		(8/25)*		(11/25)*	(1/25)*	(5/25)*

TABLA No 5.- Indicados los porcentajes de cada tipo sobre el total de Leu+ analizados. Las clases II y III corresponden a Sex A y Sex B, respectivamente (ver texto) se somete a análisis un número igual de deut de cada cultivo.

* = Fracción de leu+ en la clase/ total de Leu+

= Fracción de Leu+ en la clase/ total de leu+ capaces de crecer en medio rico, (ver texto) que fué analizado (2 o 3 por cultivo).

T A B L A N^o 6

ESPECTRO DE SUPRESION DE LAS CLASES II, III, Y IV

	MUTANTES UAG DE LAMBDA														
	<u>λ</u>	207	3	227	5	57	43	216	221	203	213	7	8	1eu	UAG
C 200(80 p sup F U80, U35, UAG2)	+	±	-	-	+	-	-	-	±	-	+	-	-	-	-
C 200 (80 sup F U80, UAG 2)	+	±	-	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	+	+
Clase II (sex A)	+	±	-	+	+	±	-	±	+z	±	+	p	-	+	+
C 200 sup B	+	±	p	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Clase III (sex B)	+	±	p	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
SC 200 sup E	+	±	+	-	+	-	±	+	+	±	+	+	+	+	+
Clase IV (sex C)	+	±	±	-	+	±	-	+	+	±	+	+	-	+	+

ABLA N^o 6.- Los espectros de supresión SC 200 (80 p sup F-U80, U35; UAG 2); SC 200 (80 p sup F-U80, UAG 2) SC 200 sup B y SC 200 sup E, (obtenidos por transducción con p1 kc, desde SC 54B y SC 54D, por selección Arg+) se presentan para favorecer la comparación con los derivados de las clases II, III y IV (ver texto, Los derivados sex A y sex B, son revertante Leu+ de SC 200 (80 p sup F-U80, U35; UAG2); obtenidos por mutagenización con etil-etanosulfonato.

de las clases II, III, y IV entre los supresores examinados a lo largo de esta tesis.

Finalmente, los derivados de la clase V se caracterizan por tener un espectro de supresión idéntico al del sup F-U80, U35 original. Por ello, se presume que el origen de esta clase es la reversión de la mutación leu UAG.

3.- Caracterización de las clases II, III y IV de protótrofos para leucina.-

Se investigó si el fenotipo de las clases II, III y IV es producto de una mutación adicional del sup F- U80, U35. Con este fin examinaron por inducción en placas (ver métodos) 28 derivados obtenidos por etil etano sulfanato, pertenecientes a estas clases. Todos estos son capaces de transducir a SC 180 un supresor de la mutación lac UAA. El espectro de supresión de los lisógenos así obtenidos es indistinguible del de sup F-U80, U35. Ninguno de estos es capaz de transducir a SC 200 un supresor de la mutación leu UAG. Por las razones anteriores, la mutación responsable de la corrección de leu UAG en las clases, II, III, y IV reside fuera de sup F - U80, U35.

Se investigó la posibilidad de que el fenotipo leu + de estas clases se debiera a la derivación de un tRNA supresor en algún punto del cromosoma. Para ello se examinó la capacidad de lisados del fago P1 kc,

crecidos en derivados de estas clases, de transducir el carácter leu^+ a la cepa SC 238 (Phi 80 p sup F - U80, U35, UAG 2), se estudiaron por este criterio ocho derivados de la clase II (tres grupos de independientes), y uno de las clases III y IV (todos obtenidos por etil etano sulfonato). En ninguno de los casos el carácter Leu^+ es transducible a la cepa indicada (que tiene la mutación leu^{UAG} de SC 200) aunque en los lisados de P1 kc usados se pudo demostrar la presencia de transductantes para otros marcadores. (Más de 10^6 transductantes Lac^+ por ml de lisado) medidos en CSH 57 B). En consecuencia, el carácter Leu^+ de estos derivados no puede ser explicado por la presencia de una mutación dominante. Un supresor corriente sería transducible con buena eficiencia en estas condiciones. La aplicación de técnicas de transducción que permitan la segregación del carácter Leu^+ no han tenido éxito en mis manos, debido a la frecuencia relativamente alta (10^{-8}) de revertantes Leu^+ espontáneos.

En búsqueda de la confirmación del resultado anterior, se examinó por otro criterio, la presencia de un supresor adicional en tres derivados obtenidos por etil etano sulfonato, pertenecientes a las clases II, III y IV. Para ello, se vió la frecuencia de aparición de derivados no supresores de estas clases, entre los resistentes al fago lambda UAG 213, cl. La presencia simultánea de más de un supresor de UAG 213 sería

detectada por una baja frecuencia de aparición de bacterias no supresoras entre los resistentes a un fago con dicha mutación. Los resistentes no supresores se distinguen de los resistentes por otros mecanismos por conservar los primeros su sensibilidad a un revertante (UAG 213)⁺ del fago usado en la selección. Por el criterio anterior, el 50% de los resistentes provenientes de las clases II y III son no supresores hecho confirmado por su fenotipo Arg⁻.

En cambio, 50 derivados lambda UAG 213, resistentes obtenidos de la clase IV mostraron ser también resistentes al derivado (UAG 213)⁺ de este fago. Estos resultados muestran que en las cepas de las clases II y III analizadas, el único supresor de UAG 213 es sup F - U80, U35; y que el representante de la clase IV tiene más de un supresor de UAG 213. El supresor adicional de este representante demostró ser no transducible por fago P₁ kc. (Ver experimento precedente). Este hecho será discutido al final del capítulo.

Los resistentes no supresores de las clases II y III seguramente surgen por excisión recombinativa de la región bacteriana del fago lisogénico, (ver Capítulo I sección 6 b), pues siguen siendo inmunes a Phi 80, y aparecen a alta frecuencia, como se espera de tal mecanismo. El profago tiene, presumiblemente, la estructura Phi 80, UAG 2.

Se examinó la posibilidad de que

en las cepas derivadas de las clases II y III existiera una mutación capaz de modificar la expresión de sup F U 80, U 35. Con este propósito, se reintrodujo el supresor sup F- U80 ocre en estos, infectando con el fago Phi 80 p sup F - U80, U35: UAG 2 y seleccionando por el fenotipo Arg+. (La cepa SC 200 es arg UAG). El supresor entra a la bacteria probablemente por recombinación del cromosoma del fago infectante con el del profago residente. El mecanismo de integración normal del fago queda excluido como explicación de este proceso, pues está reprimido en las células inmunes a Phi 80. Los espectros de supresión resultantes se presentan en la Tabla 7.

La característica más sobresaliente del derivado de la clase II, es su capacidad de suprimir algunas mutaciones UAG del fago lambda, en ausencia de tRNA supresores conocidos. La no supresión de N-UAG 213 excluye a todos los supresores mostrados en las tablas 1 y 2, y a todos los mutantes de sup F examinados por este criterio (6, esta tesis). El espectro característico de la clase II se restituye al volver a introducir sup F U80, U35 en este derivado.

El derivado proveniente de la clase III, se comporta como no supresor frente a todas las mutaciones de terminación estudiadas, en ausencia del supresor sup F- U80, U35. Sin embargo, la reintroducción de este en el derivado restituye el espectro de supresión propio de la clase III.

T A B L A N o 7

MODIFICACION DEL ESPECTRO DE SUPRESION DEL SUPRESOR SUP F- U80, U35 POR LAS MUTACIONES sex A Y sex B.

MUTANTES UAG DE LAMBDA

	λ	207	3	227	5	57	43	216	221	203	213	7	8	1 en UAG
SC 200 sex A 519 (80, UAG); *	+	-	-	-	+	P	-	-	+	-	-	-	-	-
**	+	-	±	±	+	±	-	±	+	-	-	-	-	-
SC 200 sex A 519 (80 p sup F U80, U35	+	±	-	+	+	±	-	±	+	±	+	P	-	+
UAG 2) RT. # *														
SC 200 sex B (80 UAG 2) *	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC 200 sex B (80 p sup F U80, U35;	+	±	P	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
UAG 2) RT. #														

TABLA No 7: * Incubado 16 hrs. a 37°. Este es el tiempo n normal de incubación usado (ver métodos).

** Incubado 24 hrs. a 37°

Supresor retransducido a SC 200 (80, UAG 2) sex por selección Arg⁺ (ver texto).

La propiedad de modificar la expresión de sup F - U 80, U 35, mostrada por las bacterias pertenecientes a las clases II y III corresponden a las esperadas de los mutantes en la vía de síntesis de proteínas, postulados en la introducción. La mutación responsable de estos fenotipos se denominó sex (S supresor E xpresión), usándose las letras A y B para distinguir, respectivamente, las clases II y III.

4.- Caracterización de sex A y sex B.-

Con el fin de examinar si el efecto de sex A y sex B se hace extensivo a otros supresores, se intentó la construcción de derivados sup D, sup E, sup C, sup G y sup B de las cepas sex, usando transducción por P₁kc como método. Además, se intentó la introducción de sup F G 82, U 35 usando el derivado de Phi 80 adecuado. En todos los casos se seleccionó por la corrección de la mutación arg am.

No fué posible obtener derivados sup D y sup C de sex A, ni derivados sup E y sup B de sex B, aún cuando en cada uno de estos casos se examinaron cerca de 50 transductantes Arg+, usando la recuperación de la sensibilidad a lambda UAG 213, cl como criterio de entrada del supresor. En previsión de que la modificación del supresor introducido debida a sex A impidiera el crecimiento de este fago, en cada caso se estableció el espectro de supresión de por lo

menos cuatro transductantes escogidos al azar. Todos presentaron siempre el espectro característico del sex original (Tabla 7), correspondiendo a receptores del alelo arg + de la cepa donante del fago transductor generalizado. En cada caso el lisado de Pl kc utilizado demostró tener una cantidad de fagos transductores (sobre 10^6 transductantes de supresor por ml., medidos en la cepa SC 200 por selección Arg.+) Este dato sugiere que los derivados sup D, y sup C de sex A y los derivados sup E y sup B de sex B no son viables en las condiciones experimentales usadas.

Las modificaciones de los espectros de supresión provocadas por sex A y sex B36 en los supresores estudiados de ilustran en las tablas 8 y 9. Las modificaciones introducidas en los supresores de UAG, sup E y sup F por parte de sex A son mínimas (Tabla 8). En cambio, son especialmente notables las modificaciones de los espectros de los supresores de UAA, sup G y sup B y sup F - U80, U35. La característica más sobresaliente en los cambios sufridos en la expresión de estos supresores reside en la supresión total o parcial de la mutación UAG 7 de lambda. Siendo este mutante sensible a los cambios de eficiencia de supresión, y prácticamente insensible a la naturaleza del aminoácido cargado por el tRNA supresor, el resultado anteriormente señalado sugiere que sex A aumenta la eficiencia de los supresores indicados.

Las modificaciones introducidas por

EFFECTO DE SEX A SOBRE EL ESPECTRO DE SUPRESION DE DISTINTOS SUPRESORES

	MUTANTES UAG DE LAMBDA												
	λ	207	3	227	5	57	43	216	221	203	213	7	8
sup E	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
sup E; sex A	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sup F	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
sup F; sex A	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
sup G	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
sup G; sex A	+	+	-	-	+	P	-	-	+	+	+	+	-
sup B	+	+	P	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
sup B; sex A	+	+	P	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
sup F-G82, U35	+	+	P	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
sup F-G82, U35 sex A	+	+	+	-	+	P	-	+	+	+	+	+	-

TABLA N° 8.-

Los distintos supresores fueron transducidos por P1 Kc desde SC 54. X (X=E; F; G y B) hacia SC200 o SC 200 sex A (80; UAG 2) seleccionando por Arg+. E1 sup F - G82 m se transdujo por medio del fago 80 p sup F-G 82, U35; UAG2). (seleccionando Arg+).

EFFECTO DE SEX B SOBRE EL ESPECTRO DE SUPRESION DE DISTINTOS SUPRESORES.

	λ	207	3	227	5	57	43	216	221	203	213	7	8
SUP D	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
sup D; sex B	+	±	+	-	+	P	-	-	-	np	+	+	+
sup F	+	±	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
sup F; sex B	+	+	P	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
sup C	+	±	-	±	+	±	-	-	-	-	+	-	-
sup C; sex B	+	±	-	-	+	±	-	-	+	-	+	-	-
sup G	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
sup G; sex B	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
sup F-G 82	+	±	P	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
sup F-G82, U35; sex B	+	±	+	-	+	-	-	+	+	-	+	±	-

TABLA 9.- Los distintos supresores se transdujeron por PiKc desde SC 54. X (X= D, F, C; G) hacia SC200, o SC 200 sex B 36 (80, UAG - 2), seleccionando por Arg+. El sup F- G82, U35 se trasdujo por medio del fago 80 p sup F - G82, U35; UAG - 2 (selección Arg+).

np = no probado.

sex B en los espectros de los supresores sup E y sup G son imperceptibles. En cambio son notables las modificaciones de los espectros de sup F (aparece la capacidad de suprimir UAG 3; UAG 216 y UAG 221, sup C (desaparece la capacidad de suprimir UAG 277, aparece la de suprimir UAG 221) y sup F - G 82, U 35 (aumenta notablemente la supresión de UAG 3, aparece la capacidad de suprimir UAG 7).

5.- Discusión.-

Cabe preguntarse si las características expuestas por los mutantes sex A y sex B pueden tener como explicación la derivación de un nuevo tRNA supresor en estas cepas, cuyo espectro superpuesto al de los supresores introducidos en las cepa sex, de cuenta del fenotipo observado.

Tres líneas de evidencia sugieren los mecanismos de las mutaciones sex A y sex B son fundamentalmente distintos del de los supresores de mutaciones de terminación.

En primer lugar, sex A y sex B no corrigen mutaciones que son bien suprimidas por los supresores de mutaciones de terminación, como arg UAG o UAG 213 (Tabla 7). En términos cualitativos, la principal actividad de sex A parece consistir en aumentar la eficiencia de supresión de algunos supresores (Tablas 8 y 9), y la de sex B en modificar además la especificidad de supresión.

En segundo término, los espectros de los derivados sex A- sup G, sex A- sup B y sex A- sup F- G 82, U35 (especialmente a nivel de la supresión de UAG 7 y UAG 8) no pueden ser explicados por la superposición de los espectros de supresión de los mutantes individuales. Esta observación es obviamente aplicable al caso de sex B. En cambio, dentro de los límites de resolución de la técnica de espectro de supresión, todos los derivados doblemente supresores estudiados tienen un espectro de supresión explicable por la superposición de los espectros de los supresores individuales. Además de los casos presentados en la Tabla 10, en los cuales la propiedad aditiva es inmediatamente observable, se determinó el espectro de un derivado SC 180 sup D (Phi 80p sup F - U80, U35). En este, como se espera de la propiedad aditiva, el espectro de supresión de sup D se mantiene inalterado, cubriendo el de sup F- U80, U35 (la presencia de este último es detectable por el carácter Lac + de la cepa).

En tercer término, la recesividad del carácter sex sugiere que estas mutaciones tienen un mecanismo de acción diferente que el de los supresores de mutaciones de terminación corrientes, los cuales son siempre dominantes. La recesividad del carácter sex se infiere de su intransducibilidad en condiciones en que los t RNA supresores son fácilmente transducibles.

¿A qué nivel de la vía de síntesis de proteínas están afectados los mutantes sex? Las

ADITIVIDAD APARENTE DEL ESPECTRO DE SUPRESION DE ALGUNOS SUPRESORES.-

SUPRESORES	MUTACIONES UAG DE LAMBDA												
	λ	207	3	227	5	57	43	216	221	203	213	7	8
sup F, o (80p supF UAG 2)	+	±	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
sup D	+	±	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
sup D + (80p supF, UAG 2)	+	±	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Su ⁺ 6	+	±	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Su ⁺ 6 + (80p supF, UAG 2)	+	±	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Sup B	+	±	P	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
sup B + (80p sup F, UAG 2)	+	±	P	+	+	+o	-	+	+	+	+	+	+
(80 p supF-U80, U35; UAG 2)	+	±	-	-	+	-	-	-	±	-	+	-	-
sup F+(80p supF-U80,U35;UAG 2)	+	±	-	+	+	+	-	-	±	+	+	+	+
(80p supF- G82, UAG 2)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
sup C	+	±	-	±	+	±	-	-	-	-	+	-	-
sup C + (80p supF-G82,UAG 2)	+	+	+	±	+	±	-	+	+	+	+	+	+

TABLA 10.- Los supresores y sus combinaciones se realizaron lisogenizando el fago 80 transductante en el derivado adecuado de SC 180. Los derivados ocre del fago mencionado, se introdujeron seleccionando Lact. Las cepas SC180 sup F, sup D, Su⁺6, sup B y sup C. Son derivados supresores espontáneos, obtenidos por Arg⁺ en SC 180 y estableciendo el espectro de supresión en éstos.

características pleiotrópicas de las mutaciones sex parecen excluir elementos cuya acción se ejerce sobre tRNA específicos, como aminoacil- t RNA ligasas y algunas enzimas modificantes o de maduración. La aparente recesividad del fenotipo sex eliminaría el considerar elementos capaces de interactuar con diferentes tRNA, como la enzima tRNA- nucleotidil transferasa, y otras enzimas modificantes inespecíficas. En cambio, las propiedades de los sex son compatibles con las propiedades (conocidas o esperadas) de mutantes en el ribosoma; en el factor de elongación Tu (pasos D y E, fig. 3) y en los factores de terminación.

Las mutaciones que comportan un cambio en la especificidad del ribosoma son característicamente recesivas en condiciones en que se requiere la nueva especificidad. (Por ejemplo, la resistencia a estreptomycin). Concebible, el fenotipo sex, podría ser explicado por un mejoramiento de la afinidad y/o características catalíticas de algún elemento ribosomal para uno o varios aminoacil tRNA. De acuerdo con esto, las propiedades de sex A de corregir mutaciones de terminación en la ausencia aparente de tRNA supresor recuerda propiedades análogas de la mutación ribosomal ram (15, 16, y 17). Por otra parte, el mejoramiento específico de la afinidad del factor de elongación Tu por algunos tRNA particulares explicaría, por lo menos en parte, las propiedades de los mutantes sex. Sin embargo la eficiencia

supresional de un mecanismo como el descrito debería depender de la substitución total del factor Iu normal por la especie mutante. Por ello, cabe esperar que una mutación de este tipo tuviera las propiedades de recesividad exhibidas por los mutantes sex. Se pueden hacer consideraciones análogas acerca de los factores de terminación.

Por supuesto, las especulaciones anteriores solo tienen valor como "hipótesis de trabajo". La caracterización segura de la naturaleza de las mutaciones sex debe esperar los resultados del análisis bioquímico, y una caracterización genética más completa que la aquí presentada.

En la sección 3 de este capítulo se caracterizó parcialmente un mutante de clase IV, el cual mostró propiedades consistentes con la posesión de un supresor adicional a sup F - U80, U35, el cual es no transducible. Tales propiedades pueden ser convenientemente explicadas atribuyendo a este derivado la presencia de un supresor de características semejantes a las de la mutación sex A (pero capaz de corregir la mutación UAG 213 de lambda). Esta interesante posibilidad no ha sido estudiada experimentalmente.

Finalmente, creo necesario agregar que las posibilidades del principio general de selección por "mejoramiento de situación supresional" no quedan agotadas en absoluto con el método selectivo presentado. Las posibilidades de obtener nuevas "malas situacio-

-nes supresionales" como punto de partida a nuevos criterios de selección están en práctica, limitadas sólo por el ingenio del experimentador. Por ejemplo (33) es posible derivar mutantes de clase II seleccionando mutantes de rápido crecimiento en medio mínimo-lactosa en la cepa SC 238 (ver lista de cepas) Además, el sistema selectivo aquí examinado no ha agotado sus posibilidades. Algunos resultados preliminares muestran la existencia de nuevos derivados Leu⁺ con espectro de supresión alterado, que formarían en clases distintas a las mostradas en la Tabla 5.

CAPITULO IIIR E S U L T A D O S.SELECCION POR DECREMENTO DE SITUACION SUPRESIONAL1.- Teoría y Práctica del sistema selectivo.-

Según se discutió anteriormente, (Capítulo I, sección 4), la selección de derivados de mala situación supresional a partir de una buena situación de esta clase, debiera permitir el aislamiento de dos tipos principales de mutantes. Estos tipos serían:

- a) mutaciones que afecten la estructura del tRNA supresor. La aplicación de sistemas selectivos análogos al propuesto aquí, han permitido aislar varios mutantes de sup F (26, 34).
- b) Mutaciones que provoquen cambios de especificidad en los elementos de las vías de utilización o síntesis de tRNA supresor, que incidan en una baja actividad de estos elementos frente a dicho sustrato.

El sistema de selección usado en esta tesis se basa en buscar derivados termo resistentes en un lisógeno sup F para el fago lambda N, UAG 7, UAG 53; cl ts 857; O, UAG29, el cual para simplificar, será llamado en adelante NNO. El principio de funcionamiento de este método se basa en que todas las mutaciones UAG de este fago son bien corregidas por sup F, haciendo que su inducción sea fatal para la célula portadora. La mutación

ts 857 hace al represor del fago (el gen *ci*) inactivo a 42° C, pero funcional a 32° C. Por ello, un cultivo de lisógenos de NNO puede ser inducido cuantitativamente con sólo cultivarlo a 42° C. Por otra parte, las mutaciones UAG 53 y UAG 29 son respectivamente idénticas a UAG 213 y UAG 8 (24, Ver Tabla 2). Por ello, los lisógenos pueden sobrevivir a la termoinducción disminuyendo su situación supresional por debajo del valor necesario para corregir UAG 7 y UAG 29, aunque ésta siga manteniéndose por sobre el valor requerido para suprimir UAG 53 (o UAG 213) Esta propiedad del sistema lo hace particularmente útil para la selección de mutantes de los tipos ya mencionados, pues permite la conservación de derivados que conservan aún restos de actividad de supresión. Esta característica amplía, por ende, el espectro de situaciones supresionales potencialmente obtenibles por la aplicación del procedimiento de selección descrito.

2.- Aislamiento y clasificación de derivados termorresistentes.-

Las cepas escogidas como punto de partida para la selección de mutantes de mala situación supresional son SC 296 (cuyas características relevantes son las mutaciones sup F⁻, rec A⁻, trp⁻UAG, arg⁻UAG y str A⁻) y SC 233. (el cual es el antecesor rec A⁺, str A⁺ de SC 296).

Los derivados termo resistentes a 42° de SC 296 (NNO) aparecen con una frecuencia aproximada de 10⁻⁶. Esta es cerca de cien veces menor que la frecuencia de dichos derivados en la cepa

análoga SC 233 (NNO) que es rec A⁺. Esto sugiere que rec A⁻ efectivamente disminuye la desaparición del alelo sup F⁻ por recombinación, en forma consistente con el concepto de la participación del mecanismo de recombinación generalizada en la producción de derivados no supresores (discutidos ya en la sección 6 b, Capítulo I). Con la intención de disminuir la frecuencia de aparición de este tipo de derivados, se efectuó preferentemente el procedimiento selectivo en células deficientes en recombinación (rec A⁻).

El procedimiento de termoinducción del profago NNO se aplicó corrientemente sobre $1-2 \times 10^7$ células procedentes del cultivo de SC 296 (NNO) en su fase de crecimiento estacionario. Después de 16 horas de incubación en placas de Triptona, a 42°; se distingue entre las colonias de termorresistentes un "Background" de células no crecidas, el cual cubre cerca del 10% de la superficie de las placas de derivación. Dicho "background", al ser cultivado a 32°; demuestra ser indistinguible de la cepa parental SC 296 (NNO) en base a los criterios de:

a) requerimientos. b) presencia de un supresor de N-UAG 213 y c) frecuencia y aspecto de los termorresistentes a 42°. El "background" disminuye o aumenta al respectivamente disminuir o aumentar la concentración de células por unidad de superficie de las placas de derivación. Este "background" disminuye pero persiste, al usar medios más enriquecidos que Triptona en el procedimiento de selección. El comportamiento de SC 233 (NNO) frente a este procedimiento selectivo es similar en sus aspectos generales, aunque en este caso no se estudió la naturaleza del background.

Las colonias termorresistentes después de ser purificadas a 32° o 42° en Triptona, se examinan rutinariamente por tres criterios. Estos son:

- a) Capacidad de crecer en medio mínimo sin triptofano, a 32°, para ensayar la capacidad de corregir la mutación trp UAG.
- b) Capacidad de crecer en medio mínimo sin arginina, para ensayar la capacidad de corregir argUAG a 32° .
- c) replicación sobre placas de Triptona separadas con 10⁹ fagos lambda imm 434, UAG 213, cl para ensayar a 32°, la capacidad de corregir UAG 213 . Las pruebas indicadas proporcionan tres criterios independientes de la funcionalidad de sup F, el cual en las cepas parentales SC 296 (NNO) y SC 233 (NNO) corrige bien las mutaciones especificadas.

Los criterios señalados permiten distinguir tres clases de termorresistentes (Tabla 11). La clase A está formada de bacterias que tienen un supresor funcional en base a todos los criterios probados. Esta clase no ha sido estudiada, y seguramente se debe a un "escape" del método selectivo, pues su proporción relativa al total de termorresistentes disminuye al realizar la purificación a 42° C (Tabla 11). Sin embargo, la clase A es termorresistente. Probablemente, esta clase también incluye mutantes con deleciones de parte o el total del profago NNO. La clase B carece de actividad de supresión detectable por alguno de los criterios descritos.

Finalmente, la clase C está integrada

T A B L A N º 11

Cultivo	Células Probadas	Clase A		Clase B		Clase C	
		sus 213 bles Trp+ Arg+.	** sensi- bles Trp+ Arg+.	sus 213 resistentes Trp+ Arg-	resisten sus 213 bles Trp- Arg-	sensi- bles Trp- Arg-	Cepas derivadas
1 *	100	53		41		6	
2 *	49	38		11		0	
3 *	115	75		38		2	
4 *	56	18		37		1	SC 232
5 +	17	0		17		0	SC 297 SC 298 SC 299
6 +	57	4		51		2	SC 266
7 +	59	5		54		0	
8 + #	15	5		10		0	SC 300 SC 301 SC 302
9 +	17	4		13		0	SC 273

Salvo en los casos indicados, los termorresistentes vienen de SC 296; rec A⁻, trp UAG, arg UAG, sup F⁻, (NNO). Los otros marcadores se detallan en "Lista de cepas" NNO es lambda UAG-N 7, 53 cl ts 857; UAG- 029. o Requerimientos probados a 32º C, incubación por 24 hrs.

* Termorresistentes purificados a 32º C.

+ Termorresistentes purificados a 42º C.

Derivado sup F (selección Trp+ Arg+) de SC 232 relisogenizado con NNO y termoinducido.

** UAG 213 está en lambda imm 434, UAG-N 213 cl. Su supresión se prueba a 32º C.
! SC 233 (NNO), once grupos de independientes en los 17 probados.

por bacterias que poseen una actividad supresora débil, en base a la incapacidad de crecer en ausencia de triptofano y/o arginina y la capacidad de suprimir a UAG 213.

3.- Caracterización de las clases B y C.-

Con el fin de emprender la caracterización, se escogieron algunos derivados de las clases B y C, los cuales se sometieron al proceso de "cura" o eliminación del profago NNO. La figura 7 muestra la genealogía de estas y de otras cepas derivadas con el propósito de usarlas como controles durante la caracterización. Los marcadores genéticos de ellas se detallan en la Tabla 12. La efectividad del proceso de cura se controló por las satisfacción simultánea de los siguientes criterios:

- a) Desaparición de la inmunidad de lambda, ensayada a 32° C.
- b) Ausencia de inmunidad al fago 21, para examinar la poco probable eventualidad de que el fago lambda b2 imm 21 usado en el proceso de cura (ver "métodos") hubiera integrado en el cromosoma bacteriano.
- c) Ausencia de termosensibilidad a 42° en los derivados sup F obtenibles de estas cepas. (Ver secciones 4 y 5 de este capítulo.
- d) Ausencia de genes específicos de lambda, en base a cuya ausencia se infiere la inexistencia del resto del profago. Esta determinación se realizó examinando el patrón de crecimiento a 37° C de mutantes UAG del fago lambda sobre las células "curadas". La prueba es lo suficientemente sensible como para detectar

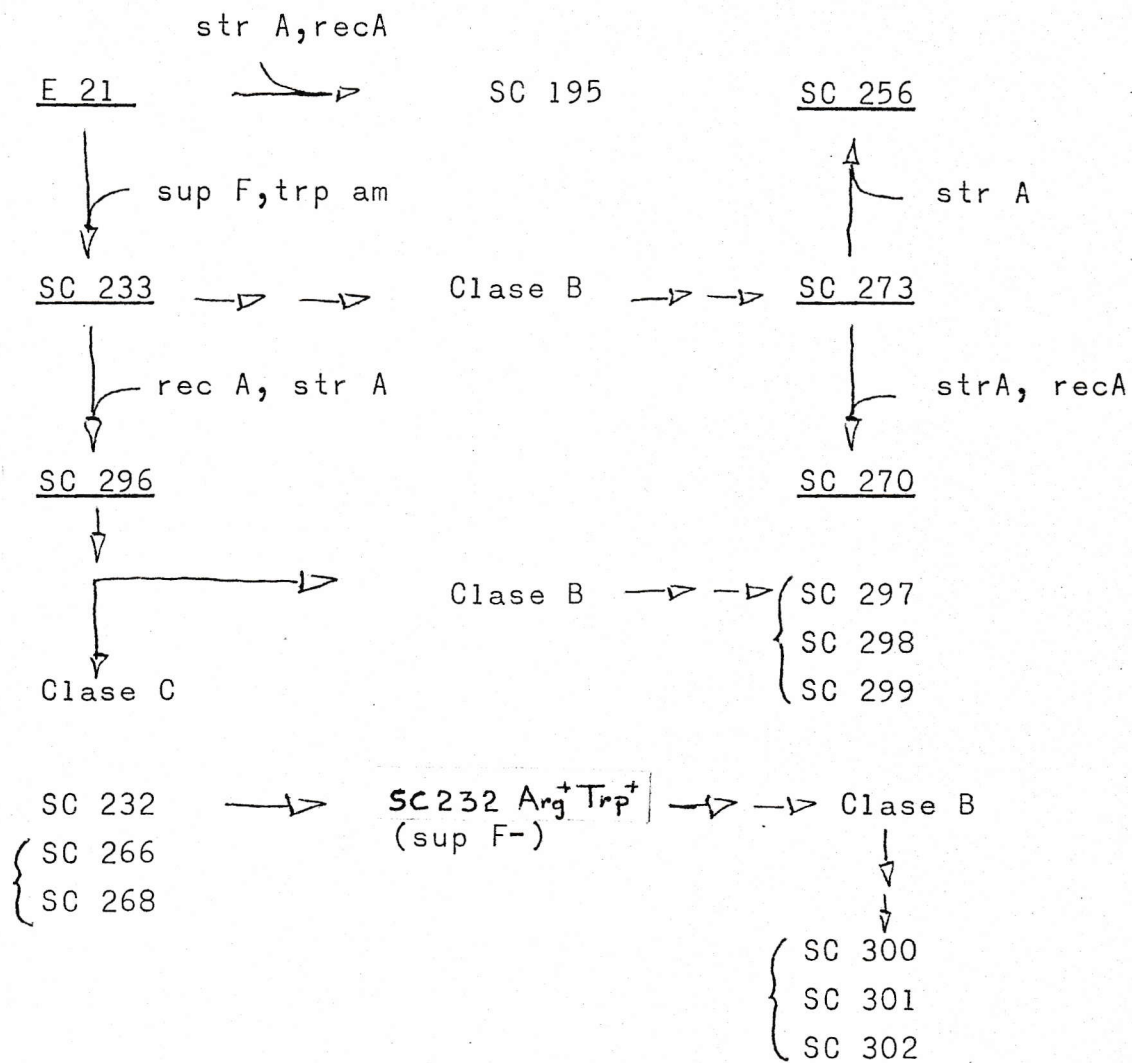


FIGURA 7.- Genealogía de los mutantes sos y de alta frecuencia de reversión. Las características genotípicas se dan en la Tabla 12. Las clases B y C se definen en el Texto. Los mutantes que provienen de un mismo cultivo están abarcados por una llave. Los marcadores rec A⁻ y str A⁻ provienen de la cepa AB 3113. Los marcadores sup F y trp^{UAG}, de la cepa SC 54 F. La doble flecha implica varias etapas. (Ver texto).

T A B L A N^o 12

ALGUNAS CEPAS DE LA FIGURA 7 Y SUS CARACTERISTICAS GENOTIPICAS
y Y FENOTIPICAS

CEPA	GENOTIPO	CONOCIDO	FENOTIPOS DEMOSTRADOS
E 21	Hfr P _{4x6}	, met B, arg UAG-E21;	Met ⁻ Arg ⁻
SC195	Hfr P _{4x6}	, met B ⁻ , argUAG-E21, strA ⁻ rec A/	Met ⁻ , Arg ⁻ , Sm(*) resistente, sensible a la luz ultra- violeta..
SC 233	Hfr P _{4x6}	, met B, argUAG-E21, trpUAG sup F.	Met ⁻ ; su+ 3
SC 296	F ⁻	; met B, arg UAG-E21, recA, trpUAG, sup F, strA	Met ⁻ ; Su+ 3; Sm(*) resis- tente, sensible a la luz ultravioleta.
SC 273	Como SC 233		Como SC 233, alta frecuen- cia de reversión (!).
SC 270	Como SC 296		Como SC 296, alta frecuen- cia de reversión (!), no supresor.
SC 256	Como SC 233,	pero strA	Como SC 233, Sm(*) resis- tente, no supresor.
SC 297	Como SC 296		Como SC 296, alta frecuen- cia de reversión (!) "sos" no supresor.
SC 232	Como SC 296		Como SC 296, alta frecuen- cia de reversión (!) "sos" Su+ SC 232 (#)
SC 268	Como SC 296		Como SC 296, alta frecuen- cia de reversión (!) "sos" Su+ SC 268 (#)
SC 266	Como SC 296		Como SC 296, alta frecuencia de reversión (!) Su+ SC 266 (#).

<u>CEPA</u>	<u>GENOTIPO CONOCIDO</u>	<u>FENOTIPOS DEMOSTRADOS</u>
SC 301	Como SC 296	Como SC 296, no supresor +"sos".
SC 298	Como SC 296	Como SC 296 no supresor, "sos".

TABLA Nº 12.-

(*) Sm = estreptomicina

(#) ver tabla Nº 17 Reemplaza al fenotipo
Su[#] 3.

(!) seleccionando por Arg⁺, Trp⁺. Ver texto.

la recombinación con el profago 434 y los genes *A, E, P, Q* y *R* del profago lambda (tabla 13). La Tabla 13 (filas 1-5) muestra como la lisogenización de una célula supresora con un fago lambdaoide adecuado está correlacionada con la aparición de la capacidad de crecimiento de un bloque de mutantes de lambda. Por analogía, el proceso inverso, o sea la pérdida en bloque de la capacidad de crecimiento de algunos mutantes de lambda, correlacionada con un proceso de cura eficiente (en base a los criterios a, b y c anteriormente citados), es indicativo de la persistencia de actividad de supresión, a la cual se atribuye el crecimiento de los mutantes restantes. (Tabla 13, filas 6-12).

En base a los criterios anteriores, el patrón de crecimiento (Tabla 13) de los mutantes **UAG** de lambda en los derivados de la clase C debe ser explicado por la persistencia de actividad de supresión en esta clase. Además, los fagos que crecen en las "manchas" mantienen su mutación **UAG**, lo que indica que no provienen de recombinación con un eventual profago lambdaoide en estado críptico. En los derivados de clase B no crece ningún fago de los usados en la determinación del espectro de supresión (excepto lambda normal). En base a este criterio, los derivados de clase B analizados carecen de profago y actividad de supresión residual.

INTERACCION DE MUTANTES UAG DE LAMBDA CON DIVERSOS PROFAGOS

CEPA	MUTANTES UAG DE LAMBDA										
	λ 207	3	227	5	57	43	216	221	213	7	8
sup F (*)	+	±	+	+	+	-	-	-	+	+	+
SC180 sup F(434)	+	±	+	+	+	±	±	-	+	+	np
SC180 sup F(λ imm434)	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	np
C 600 sup D	+	±	-	+	-	±	+	+	+	+	+
C 600 (λ imm 434)	+	±	+	+	+	±	+	+	+	+	+
SC 233(NNO) clase B	+	±	+	+	±	±	+	+	-	-	-
SC 296 (NNO) clase B(#)	+	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-
SC 233 clase B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC 296 clase B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC 296 (NNO)clase C (#)	+	±	±	±	±	±	±	±	+	+	-
SC 232 (x)	+	±	-	+	-	-	-	-	+	+	-
SC 266 (x)	+	-	-	±	-	-	-	-	±	±	-
SC 268 (x)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-

TABLA 13.- * Espectro de sup F en SC 180, SC 233 y SC 296 - (#) NNO es alambda UAG-N 7,53; cl ts 857; UAG-029.

(x) Clase C "curadas" de Lambda NNO como se indica en métodos. El fago que crece en los "spot" de UAG 207, UAG 227, UAG 5 y UAG 213 mantiene la mutación sus.

4.- Búsqueda de mutantes de fenotipo "sos" en las clases B y C.-

El común denominador de las mutaciones que disminuyan la eficiencia de la interacción de los elementos de la vía de síntesis de proteínas con el tRNA supresor, consiste en la eliminación total o parcial de su fenotipo "supresor" por parte de una segunda mutación en otra función celular. Esta segunda mutación es "supresora" de la primera, en base a la definición general de "supresores" (dada en la sección 3, Capítulo 1). Esta es la justificación de la denominación de "supresor de supresor" o sos (Suppressor Of Suppressor) asignada a las mutaciones de este tipo.

Como primera aproximación a la búsqueda de mutantes sos, se examinó la capacidad de los termoresistentes de clase B para recuperar su carácter prototrófico para arginina y triptofano lisogenizando con fago Phi 80 p sup F, UAG 2.

Los mutantes "sos" capaces de disminuir la eficiencia de sup F por debajo del nivel necesario para corregir dichas auxotrofías, debieran ser detectados por no crecer en ausencia de estos aminoácidos en las condiciones señaladas. Con el propósito de buscar los eventuales mutantes sos de esta clase, se replicaron 67 representantes de la clase B (cultivos 2, 3 y 4, Tabla 11), sobre placas de medio mínimo sembradas con $10^8 - 10^9$ fagos 80 p sup F, UAG 2, seleccionando la supresión de trp UAG y arg UAG simultáneamente. No se encontraron, entre los en-

-sayados, derivados que mantuvieran su carácter auxotrófico después de 48 hrs. de incubación. Este dato sugiere que no existen en esta clase mutantes sos capaces de disminuir la eficiencia de sup F por debajo del nivel necesario para la corrección de arg UAG y/o trp UAG. Como veremos en la sección subsiguiente, en esta clase parecen ser abundantes los mutantes sos con una actividad más restringida de decremento de situación supresional.

Con el fin de examinar más cuidadosamente la presencia de derivados sos en las clases B y C, se examinó la posibilidad de que algunas de estas modificarán la expresión de sup F en forma detectable por el espectro de supresión. Para ello, se lisogenizó Phi 80_p sup F, UAG 2 en las cepas (curadas del profago NNO) SC 232, SC 256, SC 266, SC 268, SC 270, SC 273, SC 297, SC 298 y SC 301-. SC 301 es un derivado de clase B obtenido de un revertante a sup F⁻ de SC 232. (ver figura 7 y tabla 12) El espectro de supresión de los lisógenos obtenidos es indistinguible del que presenta sup F⁻ en las cepas SC 296 y SC 195 (Phi 80_p Sup F, UAG 2). El resultado anterior muestra que ninguna de las cepas analizadas tienen una mutación SOS capaz de modificar el espectro de supresión de sup F. Por consiguiente el fenotipo de supresor débil presentado por los miembros de clase C analizados (SC 232, SC 266 y SC 268) debe ser atribuido a una mutación de sup F en esas cepas. La ausencia de actividad supresora en los miembros de clase B analiza-

-dos no puede ser explicada por la presencia de un gen sup F⁻ en buen estado, hecho críptico por una mutación de tipo sos.

Se examinó la capacidad de algunos mutantes de clase B y C para modificar la expresión de supresores más débiles que sup F, para investigar sos detectable operacionalmente sólo por su acción en supresores de baja eficiencia. Con este propósito, se lisogenizó a los derivados de clase B, SC 256, SC 270, SC 273, SC 297, SC 298 y SC 301, y a los de clase C, SC 232 y SC 266 con el fago Phi 80 p sup F- A₁, UAG 2. El mutante sup F- A₁ es un supresor débil termosensible a 42° C (11). La tabla 14 muestra que el espectro de supresión de este tRNA mutante es perceptiblemente modificado por el alelo str A⁻ presente en estas cepas (líneas 1 y 2), como se aprecia en los lisógenos para la cepa parental E 21 y su derivado str A⁻ rec A⁻ SC 195. El mismo efecto se aprecia en los lisógenos para el derivado rec A⁺ str A⁺ de clase B SC 273, y sus descendientes rec A⁻ str A⁻ SC 270 y str A⁻ rec A⁺ SC 256. Este hecho, incidentalmente, demuestra que rec A no influye en la modificación del espectro de supresión.

El espectro de supresión de sup F-A₁ en las otras cepas str A⁻ de clase B y C está perceptiblemente modificado con respecto al que presenta este supresor en la cepa isogénica SC 195 (tabla 14, líneas 3 y 4). En base a este criterio, los mutantes de clase B, SC 297, SC 298 y SC 301, y los de clase C, SC 232 y SC 266, poseen una mutación sos.

T A B L A N° 14

ESPECTROS DE SUPRESION DE sup F Y DERIVADOS EN CEPAS DE LAS CLASES B Y C.

SUPRESOR	EFECTORES	CEPAS (+)	MUTANTES DE LAMBDA										MUTANTES BACTERIANOS				
			λ	207	3	227	5	57	43	216	221	213	7	NNO	(trpUAG;	argUAG;	
supF-A1	---	E21, SC 273	+	±	±	-	±	-	-	-	+	++	+	±	np	-(*)	+(?)
supF-A1	strA	SC 256, SC270, SC195	+	±	-	-	±	-	-	-	+	+	+	ϕ	np	-(*)	±(!)
sup F-A1	sos, strA	SC297, SC298, SC301	+	p	-	-	-	-	-	-	+	+	±	-	np	-(x)	-(x)
sup F-A1	sos, strA	SC 232, SC 266	+	p	-	-	-	-	-	-	+	+	±	-	np	np	np
supF-G82	sos 7	SC 301	+	±	+	-	±	-	±	+	+	+	+	+	+	np	np
supF-682	sos 8	SC 298	+	±	±	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	np	np

TABLA N° 14.- se prueba la supresión simultánea de arg y trp a las t_0 indicadas. El espectro de supresión de fagos se realizó a 37° C. NNO es lambda UAG-N7, 53; cl ts 857; UAG-029. (+) Cepas en figura 8 y en el texto. (*) Aproximadamente 10-6 revertantes en Rec+; menos de 10-8 en Rec- (?) crece en 16 hrs. (!) crece en 32-48 hrs. (x) menos de 10-8 revertantes.

El espectro de supresión que presenta sup F- A1 en las cepas de clase B es distinto del que presenta en la clase C, probablemente por es tar superpuesto al espectro del supresor débil originalmente presente en esta última clase. El espectro de sup F- A1 en SC 298 y SC 301 es idéntico. Sin embargo, el fenotipo SOS de estas dos cepas puede ser distinguido en base a la determinación del espectro de supresión de estas cepas para sup F- G 82.

Finalmente, las mutaciones responsables del fenotipo "sos" difícilmente pueden corresponder al defecto en las funciones bacterianas relacionadas con el crecimiento de lambda análogas a ron (36, 37) gro N (38,39) o nus (40). Es difícilmente concebible que mutaciones de este tipo afecten además el comportamiento de las auxotrofías bacterianas trp UAG y/o arg UAG.

5.- Caracterización de mutantes de sup F en las clases B y C.-

El estudio detallado de los mutantes de clase C preliminarmente caracterizados en la sección anterior, está justificado porque en ellos existe una mala situación supresional entre las mutaciones arg UAG y trp UAG con el supresor residual presente en estas cepas. Como ya se mostró en el capítulo 1 podría intentarse la derivación de nuevos mutantes análogos a los de tipo sex ya analizados. Con este propósito se buscó revertantes Trp^+ y Arg^+ de los mutantes de la clase

C descritos, previa eliminación del profago NNO. Inesperadamente, estos mutantes revierten al fenotipo seleccionado con frecuencias significativamente superiores a las observadas en la cepa análoga sup F⁺ SC 195 (tabla 15). El hecho de que la región sup F sea una duplicación debe dar lugar a que los mutantes debidos a cambios de base que aparecen en esta región tengan la posibilidad de recobrar con alta frecuencia el fenotipo supresor por regeneración recombinativa del alelo sup F⁻ (a través de un mecanismo como el mostrado en la figura 6, ref 23). Sin embargo, en este caso la alta frecuencia de reversida observada no puede ser explicada por este mecanismo, debido a la presencia del alelo sec A⁻ en estas cepas, y a su persistencia en todos los revertantes.

Cabe preguntarse si en las capas de clase B existen mutaciones de alta frecuencia de reversión al fenotipo supresor (Arg⁺ Trp⁺). Con este fin, se determinó esta frecuencia en seis derivados de clase B, a saber: SC 297, SC 298, SC 299, SC 300, SC 301 y SC 302 (ver genealogía en figura 7). Sólo uno de ellos, SC 297, mostró una frecuencia de reversión alta al fenotipo supresor, Esta fue 10 a 100 veces mayor que las observadas en las cepas SC 298 hasta SC 302. Sin embargo, esta frecuencia fue sólo 3 a 4 veces más alta que aquella con que la cepa isogénica) (trp⁻, sup F⁺) SC 195 revierte al fenotipo Arg⁺. Las diferencias de uno a dos órdenes de magnitud entre las frecuen-

CARACTERISTICAS REVERSIONALES DE LAS CLASES B Y C

CEPA	CLASE	FENOTIPO SELECCIONADO	FRECUENCIA DE REVERSION &	FRECUENCIA DE sup F ENTRE REVERTANTES SUPRESORES	FRECUENCIA RELATIVA DE sup F (+)
SC 195	-	Arg+	$1.34 \pm 0.6 \times 10^{-8}$ (11)	* 10% (27) #	1
SC 273	B	Arg+ Trp+	$4.8 \pm 2.3 \times 10^{-8}$ (5)	100% (15)	48
SC 270	B	Arg+ Trp+	$4.63 \pm 0.3 \times 10^{-8}$ (5)	100% (15)	46
SC 297	B	Arg+ Trp+	$3.8 \pm 0.1 \times 10^{-8}$ (4)	100% (23)	38
SC 232	C	Arg+ Trp+	$0.96 \pm 0.2 \times 10^{-6}$ (7)	100% (37)	960
SC 266	C	Arg+ Trp+	$3.6 \pm 0.5 \times 10^{-7}$ (6)	** 13% (23)	47 (360!)
SC 268	C	Arg+ Trp+	3.04×10^{-6} (2)	100% (15)	3040
SC 298	B	Arg+ Trp+	2.5×10^{-10} (3)	< 100% (1)	-
		Arg+	1×10^{-9} (1)	-	-
		Trp+	5.0×10^{-9} (3)	-	-
SC 301	B	Arg+ Trp+	3.6×10^{-10} (2)	< 100% (5)	-
		Arg+	6.3×10^{-9} (3)	-	-
		Trp+	5.4×10^{-9} (3)	-	-

qTABLA N º 15.- * Estimado de los datos de la Tabla 16.

** El 87% restante (20/23) son supresores del tipo Nu (ver texto).
 (+) Normalizado para la frecuencia de reversión de SC 195 a sup F⁻ ($1.0 \pm 0.4 \times 10^{-8}$).

(#) Número de revertantes analizado por espectro de supresión.

(!) Estimado sobre el total de revertantes (sup F + supMu) Ver texto.

& Número de cultivos independientes en que se determinó frecuencia de reversión.
 Estos están proporcionalmente representados en los datos de las últimas columnas.

-cias de reversión de esta cepa (SC 195) con las del grupo de SC 298 hasta SC 302, posiblemente se deben a un artefacto relacionado con el diferente procedimiento de selección al que son sometidos estos mutantes (Arg^+ para el caso de SC 195, Arg^+ Trp^+ para los otros). Esta afirmación es consistente con la observación de que la frecuencia de reversión de SC 298 y SC 301 a Arg^+ o Trp^+ es cercana a la observada en SC 195 (tabla 15). Todos los revertantes Trp^+ Arg^+ de SC 297 conservan su carácter rec A-.

Debido a que en el procedimiento de selección usado para determinar la frecuencia de reversión, puede surgir cualquier supresor, se normalizó esta frecuencia midiendo la proporción de sup F entre los revertantes obtenidos. La última columna de la tabla 15 muestra los cuocientes entre la frecuencia de aparición de sup F en algunos derivados de clase B y C y la frecuencia de aparición de sup F en SC 195. (estimada como 1.10^{-9} sup F/célula, de acuerdo a los datos presentados en la tabla 16).

Estos datos muestran que dos de los derivados de clase C SC 232 y SC 268 dan revertantes sup F con frecuencias respectivamente 1.000 y 3.000 veces superiores a la de SC 195 (el caso de SC 266 será analizado en la sección siguiente. El derivado de clase B, SC 297, presenta una frecuencia de reversión a sup F⁻ 40 veces superior a la de SC 195, lo cual incidentalmente muestra que el fenotipo no supre

T A B L A N^o 16

TIPOS DE SUPRESORES ENTRE LOS DERIVADOS Arg+ ESPONTANEOS
DE SC 195

Cultivo	Colonias		Tipo supresor						No supresores
	Arg+	Probadas	D	E	F	C	B	X	
1	5		1	1	-	-	1	-	2
2	5		-	4	-	-	-	-	1
3	5		-	3	-	1	-	-	1
4	2		1	-	-	-	1	-	-
5	5		-	1	3	-	1	-	-
6	3		3	2	-	-	-	-	1
7	1		-	-	-	-	-	1	-
8	3		1	1	-	-	-	-	1
9	1		-	-	-	-	-	-	1
10	1		1	-	-	-	-	-	-
11	5		1	2	-	-	-	-	2
TOTALES	36		5	14	3	1	3	1	9
Grupos de Independientes.	11		5	7	1	1	3	1	9
	3/27		Sup F supresores totales						
	1/18		Sup F independientes/supresores independientes totales						
	1/10 Cultivos		con sup F/total de cultivos.						
	27/36		Revertantes						
			supresores/ total de revertantes Arg+						

TABLA 16.- Los revertantes Arg+ de SC 195 se probaron por espectro de supresión. sup X es un supresor cuyo espectro no corresponde a ninguno de los supresores presentados en la Tabla 1. Corrige bien a UAG 5 y UAG 213. No corrige UAG3, UAG 227, UAG 57, UAG 43, UAG 216, UAG 221 ni UAG 7.

-sor de SC 297 no se debe a la delección de la región sup F. En las cepas anteriormente nombradas, el 100% de los revertantes Trp^+ Arg^+ son sup F⁻. El único revertante de SC 298 y las cinco revertantes de SC 301 analizados no son sup F, lo que muestra que en estos, la frecuencia de sup F entre los revertantes fenotípicamente supresores es menor que el 100%.

Con el fin de investigar la relación de la alta frecuencia de reversión a sup F⁻ con la recombinación, se examinó la frecuencia de reversión al fenotipo Arg^+ Trp^+ (determinada a 32° C) de once derivados independientes de SC 233 (NNO), pertenecientes a la clase B. (Ver última línea de tabla 11). Uno de estos, SC 273, revierte al fenotipo Arg^+ Trp^+ con una frecuencia de $5 \cdot 10^{-8}$, siendo el 100% de los revertantes sup F⁻ por espectro de supresión. Esta frecuencia es 50 veces superior a la observada en SC 195. Los 10 restantes derivados de clase B revierten al fenotipo supresor (Arg^+ Trp^+) con una frecuencia menor que $2 \cdot 10^{-9}$. Se introdujo el gen rec A⁻ en SC 273 por cruce con AB 3113 (Seleccionando por resistencia a estreptomycin). La frecuencia de reversión de este derivado denominado SC 270 a los fenotipos Arg^+ Trp^+ y sup F⁻ son idénticas a las similares observadas en SC 273 (tabla 15). Este resultado prueba que la propiedad de alta frecuencia de reversión a sup F⁻ de SC 273 no puede ser atribuída al mecanismo de regeneración recombinacional.

Con el propósito de investigar si existen en la clase B cepas de frecuencias de reversión comparables a la de la clase C, se examinaron 104 lisógenos para NNO de clase B y C (provenientes de los cultivos 6 y 7 de la tabla 11) por su frecuencia de reversión al fenotipo $\text{Trp}^+ \text{Arg}^+$ a 32°C . Para esto, se sembraron 2 a $3 \cdot 10^7$ lisógenos de cada cepa en sectores de placa de medio selectivo. Por este método debiera ser posible detectar cepas con frecuencias de reversión significativamente mayores que $5 \cdot 10^{-8}$. El examen de los 104 derivados de clase B y C no mostró cepas de frecuencia de reversión mayor a este valor, excepto los dos derivados de clase C (los cuales fueron "reencuadrados" por su alta frecuencia de reversión, en el diseño experimental adoptado, que usó tal "reencuentro" como control).

Todas las cepas que mostraron más de tres revertantes a los dos días de incubación (menos del 5% del total), fueron reanalizados más cuidadosamente por frecuencia de reversión. mucho mayor que $5 \cdot 10^{-8}$ en la clase B, sugiere que el fenotipo de clase C y las frecuencias de reversión mayor que 10^{-7} están casualmente relacionados. La frecuencia de mutantes de alta frecuencia de reversión a sup F⁻ entre la totalidad de mutantes de clase B es difícil de determinar debido a las dificultades que presenta analizar este fenotipo numerosos mutantes. Sin embargo, dado que se encontró un miembro de alta frecuencia de reversión entre

seis representantes de clase B (provenientes de SC 296) escogidos al azar; y otro miembro de alta frecuencia de reversión entre once termoresistentes de clase B, provenientes de SC 233, y también escogidos al azar, se puede estimar la frecuencia total de aparición del fenotipo indicado como cercana al 10%.

La alta frecuencia de reversión a fenotipo tipo sup F⁻ mostrada por los derivados de clase C y 2 de la clase B no es explicable en base a la presencia de "genes mutadores" (41) pues estos afectarían la frecuencia de mutación de otros genes de esta cepa. Este no es el caso en las cepas analizadas (incluyendo a SC 266, que será analizado a continuación) pues sus frecuencias de mutación al fenotipo rifampicina resistente es idéntico al de las cepas parentales no mutantes.

Por último, los supresores que aparecen en los derivados Arg⁺ y Trp⁺ son transducibles a SC 180 (seleccionando Arg⁺) por fago Pl Kc. La transducibilidad de estos supresores demuestra que el evento responsable del aumento de eficiencia del supresor ocurre en el locus supresor mismo o en un sitio muy cercano.

6.- Análisis de la propiedad de alta frecuencia de reversión de SC 266.-

Como se mostró anteriormente, SC 266 es un derivado de clase C de alta frecuencia de reversión al fenotipo supresor (Arg⁺ Trp⁺)

Sin embargo, a diferencia de los otros derivados de clase C analizados anteriormente, sólo el 13% de sus revertantes son sup F⁻, lo cual de todas maneras lo hace significativamente diferente a SC 195 en frecuencia de reversión a dicho fenotipo (ver tabla 15). El restante 87% de los revertantes son, por espectro de supresión, distintos a sup F en la no corrección de la mutación UAG 7 de lambda (línea 4 tabla 17), lo que los clasifica como supresores débiles. Este nuevo fenotipo ha sido denominado "Nu".

Inesperadamente, pues nunca esta cepa ni sus antecesores han estado en contacto con Phi 80, la mitad de los derivados "NU" de SC 266 (18/36 en 7 cultivos independientes) restringen el crecimiento de distintas líneas del fago Phi 80. La tabla 18 muestra las propiedades restrictivas de cinco derivados "NU" independientes medidas a través de la eficiencia de plaqueo (título del fago en el huésped restrictor dividido por su título en el no restrictor). Los fagos Phi 80, Phi 80 cl, Phi 80 h⁻; Phi 80 p sup F, UAG-2 h⁻ y Phi 80 p Su⁺ III-G 82, h⁻ (este último, un fago transductor de sup F- G 82) de estructura diferente al transductor normalmente empleado a lo largo de esta tesis. ref. 20) crecen mal en los derivados "NU" (eficiencias de plaqueo entre 10^{-5} y 10^{-7}) y crecen bien en la cepa control SC 195, en SC 266 y uno de sus revertantes sup F⁻ (eficiencias de plaqueos superiores a 0,1). La excepción a esta regla es "NU" 21 en el cual Phi 80 cl y Phi 80 p Su⁺ III G-82, h⁻ tienen, respectivamente,

T A B L A N º 17

DIFERENTES ESTADOS DE sup F.-

MUTANTES UAG DE LAMBDA

	λ	207	3	227	5	57	43	216	221	203	213	7	8	Trp	Arg
SC 270, SC 297	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	np	-	-
SC 232	+	\pm	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SC 266	+	-	-	-	\pm	-	-	-	-	-	\pm	-	np	-	-
SC-266-Nu	+	\pm	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	np	+	+
SC 268	+	\pm	-	\pm	+	-	-	-	-	-	+	-	np	-	-
SC 296	+	\pm	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+

TABLA N º 17.- Todos los espectros presentados corresponden a supresores derivados de SC 296.-

eficiencias de plaqueo de 10^{-2} y 1. La pequeña deficiencia de los fagos h^- en SC 266 y su derivado sup F⁻ no es seguramente significativa pues este tipo de mutantes de fago característicamente tiene menos eficiencia de plaqueo en los huéspedes no resistentes a la variedad h^+ . Además SC 195 no es perfectamente isogénico con SC 266. La única línea de Phi 80 que no es restringida por las cepas de fenotipo "NU" indicadas en la tabla 18 es Phi 80 v fago capaz de crecer en lisógenos para Phi 80.

Con el fin de averiguar en contra de que genes de Phi 80 está dirigida la restricción ejercida por las variantes "NU" de SC 266, se midió la eficiencia de plaqueo de recombinantes entre lambda y Phi 80 que tienen alternativamente una u otra de las mitades del cromosoma de Phi 80 reemplazados por los genes de lambda. Todos estos fagos (Tabla 18) crecen bien en los derivados Nu, excepto hy 4, el cual es restringido por algunos de éstos. Este hecho sugiere que el fago 80 es defectivo a nivel de alguno de sus genes regulatorios (los que están desde att 80 hasta R, y que corresponden al segmento de Phi 80 presente en hy 4). Estos resultados excluyen dos de los mecanismos comunes de resistencia a Phi 80, a saber, el de resistencia de membrana (dirigido en contra de la función J de 80, situada fuera de la región de homología entre hy 4 y Phi 80, y el de inmunidad por lisogenización (dirigido en contra de la función cl, y excluido de antemano por el "pedigree" conocido de los derivados "NU").

T A B L A N º 18

ia	SC195	SC266	SC266sup F	Nu 11	Nu 21	Nu 31	Nu 41	Nu 51
	1.0	1	1	7×10^{-6} $\frac{0}{x}$	7×10^{-6} x	7×10^{-6} $\frac{0}{x}$	7×10^{-6} x	7×10^{-6} x
	1.0	1	1	1×10^{-5} $\frac{0}{x}$	1×10^{-2} +	1×10^{-5} $\frac{0}{x}$	1×10^{-5} x	1×10^{-5} x
	1.0	0.10	0.5	5×10^{-7} x	2×10^{-7} x	2×10^{-6} $\frac{0}{x}$	2×10^{-7} x	5×10^{-7} x
g-82, h ⁻	1.0 +	1 $\frac{0}{x}$	1 +	3×10^{-6} $\frac{0}{x}$	1 +	4×10^{-6} $\frac{0}{x}$	2×10^{-6} $\frac{0}{x}$	1×10^{-6} $\frac{0}{x}$
AG2, h ⁻	1.0	0.5	1	5×10^{-6}	0.5	1×10^{-7}	5×10^{-7}	1×10^{-7}
	1.0	1	1	10^{-4}	0.5	2×10^{-6}	1×10^{-4}	1×10^{-6}
	1.0	1	1	1	1	1	1	1
	1.0	1	1	1	1	1	1	1
213	4×10^{-7} *	5×10^{-2}	1.0	1	1	1	1	1
	1.0	1	1	1	1	1	1	1

x inhibición de crecimiento en la dilución cuyo título se reporta.

placa muy chica.

x placa muy chica, crece bien en cepas rec +.

0 De los escasos revertantes se obtuvieron lisados en la misma cepa donde se derivaron, o en SC 195. En ambos casos, la eficiencia de plaqueo en los ocho huéspedes analizados en esta tabla fué mayor que 0.5.

Los Datos con dos cifras significativas están afectados con menos de 5% de error.
 Los Datos con una cifra significativa, con 25% de Error.

Existe la posibilidad de operación de otro mecanismo de resistencia, el de "modificación y restricción" (42). El principio general de este mecanismo consiste en la destrucción del cromosoma del fago infectante por parte de ciertos huéspedes bacterianos. Estos no destruyen su propio DNA por estar éste químicamente modificado por un mecanismo celular que puede operar sobre algunos escasos fagos infectantes. Estos fagos al ser modificados pueden multiplicarse en el huésped restrictor, dando progenie también modificada la cual ya no es restringida. Se puede distinguir operacionalmente un fago modificado de un fago mutante capaz de crecer pues la modificación no es hereditaria. Es decir, el crecimiento de un fago modificado en el huésped no restrictor dará nuevamente progenie incapaz de crecer en el restrictor, en cambio el fago mutante conservará esta capacidad.

Para examinar esta posibilidad, se aisló (ver nota a tabla 17) 4 derivados de Phi 80 y Phi 80 cl, dos capaces de crecer en "NU" 11 y dos en "NU" 31, para cada uno de estos fagos, y uno de Phi 80 h capaz de crecer en "NU" 31. Se obtuvo "lisados en placa" de éstos en las cepas de derivación y además en SC 195 (en el último caso se partió de clones de fago purificado en esta cepa). Tanto los lisados obtenidos en las cepas restrictoras como en la no restrictora SC 195 tie-

título de los lisados probados fue siempre superior a $5 \cdot 10^9$ fagos/ml. Este resultado descarta la posibilidad de la participación de un mecanismo de "modificación y restricción" del tipo ya especificado en la resistencia a Phi 80 presentada por los derivados "NU" de SC 266.

Hasta el momento no tenemos una buena explicación para el fenotipo supresor de los derivados "NU" ni para la resistencia que presentan a Phi 80 algunos de estos. Sin embargo, el hecho de poder aislar fagos mutantes capaces de crecer en estos resistentes, abre un camino a la caracterización de la función bacteriana afectada en éstos, el cual consiste en la caracterización de la mutación del fago.

7.- DISCUSION

A.- Fenotipo sos.

En la sección anterior se han presentado datos que permiten catalogar a algunos supervivientes de la termoinducción de SC 296 (NNO) como poseedores de una mutación sos, cuyas características se definieron en la sección 1. de este capítulo. En efecto, la caracterización presentada, aunque preliminar, sugiere fuertemente que los mutantes sos han afectado la expresión del tRNA supresor. La posibilidad alternativa de que: los fenó-

del profago NNO y el espectro de supresión de mutantes de lambda esté alterado por mutaciones restrictivas del crecimiento de este fago, se ha descartado en base a que éstos derivados afectan también la corrección supresional de mutaciones bacterianas (Tabla 18). La caracterización presentada aquí abre las puertas a una caracterización genética y fisiológica más profunda de los mutantes sos, al ofrecer criterios técnicos (como el efecto en las auxotrofias trp am y arg am, cuya supresión es alterada por los sos) que permiten la manipulación analítica de estas mutaciones.

Puede parecer extraño la gran frecuencia aparente en los termorresistentes de las clases B y C, de derivados que han sufrido dos eventos mutacionales, uno de tipo sos y otro que conduce a la inactivación del supresor. Sin embargo no lo es si se considera que el sistema de selección por termoinducción (como se vio en la sección 1) es inexplicablemente bacteriostático para las células capaces de corregir bien las mutaciones del profago NNO (y no bactericida como se espera teóricamente). En base a esta característica del sistema, probablemente la mutación sos ocurre primero, y su actividad de disminución de la eficiencia de supresión de sup F aumenta la posibilidad de que este derivado sobreviva a la termoinducción del profago, tal vez, porque la misma mutación sos hace parcialmente termosensible alguna función vital de la bacteria.

La actividad de supresión residual, desventaja-

divisiones sucesivas, seguramente por segregación del supresor. Este hecho es consistente con la disminución de la clase A (relativamente al resto de los termorresistentes) al realizar la purificación de los clones termorresistentes (Tabla II). Finalmente, la atribución del fenotipo sos a mutaciones en elementos de la vía de síntesis de proteínas es solamente tentativa. La caracterización ulterior de este fenotipo requiere un replanteamiento del sistema selectivo en el que intervenga el establecimiento de métodos operacionales para separar genéticamente las mutaciones sos de las mutaciones "contaminantes" en sup F.

B.- Mutaciones de supresor.-

Se han descrito en este capítulo algunos fenómenos relacionados con la alta frecuencia de reversión al fenotipo supresor de dos miembros de la clase B y tres miembros de la clase C. En las cepas de clase C pueden distinguirse nítidamente tres tipos de actividad supresora residual (ver tabla 17). Las cepas de clase B no poseen actividad supresora residual detectable por espectro de supresión. Algunos de los derivados de este tipo presentan además la característica sos (tablas 12 y 14) Esta característica probablemente no está relacionada con el fenotipo de alta frecuencia de reversión, pues SC 270 no presenta actividad sos detectable, presentándola en cambio

SC 297. Sin embargo, ambas cepas nombradas son indistinguibles en cuanto al fenotipo de alta frecuencia de reversión (tabla 15).

Debido a dificultades técnicas no se ha podido estudiar sistemáticamente la relación de estos aparentes mutantes de supresor con el locus génico sup F. Sin embargo, los resultados presentados sugieren que el defecto responsable de la desaparición de actividad supresora del sup F originalmente presente es cis dominante, pues no altera las características de sup F cuando éste se introduce a las cepas por medio de un fago lisogénico transductor. Por esta razón, supondré en lo que sigue de la discusión, que el defecto responsable del fenotipo de estos mutantes reside en la región sup F.

Se ha descrito anteriormente el aislamiento de derivados de actividad supresora baja o nula desde cepas sup F siendo muchos de estos de alta frecuencia de reversión a este fenotipo.

Resumiré brevemente estos resultados. Análogamente el caso aquí presentado, se encuentran tres grupos de distintas frecuencias de reversión al fenotipo sup F (determinado en este caso por el espectro de supresión de mutantes r II del fago T4). Debo hacer notar que tanto en el trabajo citado como en esta tesis, el concepto de "grupo de frecuencias de reversión" probablemente no tiene bases reales, y

Uno de los grupos revierte al fenotipo supresor con frecuencia cercana a 5×10^{-9} , siendo el 20% de los revertantes fenotípicamente sup F. Presumiblemente éstos son análogos a los derivados SC 298, SC 299, SC 300, SC 301 y SC 302, presentados en la Tabla 15. Otro de los grupos revierte al fenotipo sup F con frecuencia entre 10^{-6} y 10^{-7} , y presumiblemente es semejante al grupo formado por SC 232, SC 266 y SC 268 (Tabla 15). Finalmente, un último grupo (formado por tres miembros) de frecuencia de reversión a sup F alrededor de 5×10^{-8} , el cual seguramente es análogo a SC 273 y SC 297 (Tabla 15).

Estos datos han sido interpretados en base a la postulación de un modelo estructural de la región sup F (figura 6) cuyas propiedades recombinacionales explicarían el comportamiento descrito. Tal modelo predecía implícitamente que las propiedades mutacionales y reversionales de la región sup F debían ser profundamente alteradas por la introducción de deficiencias en el sistema de recombinación de estas cepas. Sin embargo, no se realizó esta prueba crítica en el informe ya citado.

Los datos presentados en esta tesis muestran que la predicción mencionada no se verifica experimentalmente para algunos mutantes de esta región.

El único efecto observado consistente con la hipótesis recombinacional postulada,

es la disminución en dos órdenes de magnitud de la frecuencia de supervivencia a la termoinducción en la cepa SC 296 (NNO) respecto a su análoga rec A+, SC 233 (NNO). Sin embargo todos los efectos estudiados que anteriormente eran explicados en base a la hipótesis recombinacional, pueden ser demostrados en cepas deficientes en recombinación. El alelo rec A usado durante este trabajo ha demostrado en el sistema aquí presentado (datos no mostrados) y en otros (6) ser incapaz de hacer recombinar regiones genéticas cuyas homología es mayor que la involucrada en la hipótesis recombinacional. Por ende, los resultados obtenidos en esta tesis no pueden ser explicados por una actividad recombinacional residual del alelo rec A - usado. La persistencia del fenotipo Rec- en los distintos revertantes obtenidos descarta la posibilidad de que la explicación de mis resultados resida en la reversión de rec A- a su alelo silvestre correspondiente.

Mis resultados plantean dos dilemas. En primer lugar, la hipótesis recombinacional aludida toma como punto de partida una estructura de la región sup F cuyas predicciones experimentales han sido independientemente verificadas en forma bioquímica y genética (20, 22). Por ello, la estructura propuesta de la región sup F (Figura 7) debe ser esencialmente correcta, y las razones del fracaso

-acterísticas reversionales de algunos de nuestros mutantes en sup F (y que confirman las propiedades ya reportadas de esta misma región, 20) no pueden ser explicadas en base a las características conocidas de los mecanismos mutacionales normalmente operantes en *Escherichia coli* (transiciones, transversiones, inversiones, inserciones, deleciones, subtituciones).

La solución natural a estos dilemas, es, entonces, postular nuevos mecanismos mutacionales, o nuevas propiedades de los ya existentes, de modo de dar cuenta de las propiedades mutacionales de la región sup F. Con este propósito tomaré algunas propiedades de los sistemas de control génico de mutaciones que existen en maíz (43, 44) y otros organismos superiores. Las propiedades de estos sistemas son admirablemente adecuadas para explicar los resultados aquí presentados. La posibilidad de que este tipo de sistemas exista en *Escherichia coli* ya ha sido (45) analizada en forma teórica. De acuerdo a lo ya dicho, postuló que en las líneas celulares SC 233 y SC 296 existe una función génica que en lo sucesivo llamaré bug (Bacterial Unstable Gen), caracterizado por tener, análogamente a los sistemas de maíz ya aludidos, las siguientes propiedades: 1) capacidad de transponerse frecuentemente entre diferentes localizaciones del cromosoma bacteriano. 2) Capacidad de modificar la actividad del locus génico al que está unido, de varias maneras diferentes.

De acuerdo a la hipótesis anterior, el fenotipo de alta frecuencia de reversión descrito, sería provocado por la transposición y (dirigida por la selección) de un bug desde una región cromosómica "silente" a la región sup F. La hipótesis predice que:

- 1) Las mutaciones relacionadas con bug deben presentar una gran diversidad fenotípica.
- 2) Debe ser posible aislar nuevas variantes fenotípicas a partir de la mutación originalmente provocada por el bug.
- 3) Debe ser posible demostrar la transposición de bug a nuevas regiones génicas.
- 4) Debe ser posible demostrar por algún criterio, la presencia de un elemento foráneo en el gen mutado.

En forma consistente con la primera predicción, todas las mutaciones de sup F sospechosas de estar relacionadas con un bug fácilmente transponible, en base a su alta revertibilidad, además presentan independientemente una gran riqueza de aspectos fenotípicos (Tabla 17, líneas, 1, 2, 3 y 5). De acuerdo con la segunda predicción, la mutación de SC 266, presuntivamente relacionada con bug, da frecuentemente un nuevo fenotipo, Nu, (Tabla 17, línea 4) al seleccionarse de el variante Arg⁺ y Trp⁺. De acuerdo con la tercera predicción, cerca del 50% de los derivados Nu de SC 266 adquieren la capacidad de restringir a algunas líneas del fago Phi 80. La restricción es sólo parcial en el caso de "Nu" 21 y total en los "Nu" restantes (tabla 18),

lo que está de acuerdo con el postulado de que bug puede modificar en múltiples formas a una misma función. Sin embargo, en este caso, la hipótesis bug se muestra insuficiente pues no se ha descrito a nuestro conocimiento una función celular capaz de dar mutantes de resistencia a fagos de las características descritas en la sección 6.

Algunos resultados preliminares muestran que es posible demostrar la transposición de bug por otros criterios. Por ejemplo, el examen de 16 derivados resistentes a Phi 80 cl, obtenidos de SC 266 permitió el aislamiento de un auxótrofo que revierte al fenotipo prototrófico con una frecuencia aproximada de 10^{-6} .

La cuarta predicción no ha sido aún verificada. Incidentalmente, es posible demostrar por métodos físicos que muchos mutantes de los llamados "puntuales" en distintos genes de *Escherichia coli*, corresponden realmente a la inserción de la misma secuencia de DNA foráneo (46, 47, 48). Característicamente, este tipo de mutantes de inserción es capaz de revertir a gran variedad de frecuencias. El fenómeno está relacionado con la pérdida de la inserción, y puede verificarse en células deficientes en recombinación (49). Por esto, creo que las secuencias de inserción aludidas o "insertosomas" son buenos candidatos para corporeizar la función bug postulada en esta tesis.

Finalmente, debe agregar que la hipótesis bug tiene solamente el valor de ser una de las posibles hipótesis que pueden ser generadas "ad hoc" para unificar la discusión de las propiedades de un grupo de mutantes de supresor. Se escogió esta hipótesis por ser la que requería el menor número de supuestos iniciales de todas las hipótesis alternativas consideradas. Entre alguna de estas hipótesis alternativas mencionaré:

- a) la posibilidad de que las características de los mutantes de supresor se deban a la alternación de un mecanismo regulatorio que involucre esta función (por ejemplo un operón).
- b) Estructuración secundaria masiva del cromosoma en la región sup F, que puede ser alterada por mutantes puntuales y
- c) Mutaciones de tipo sex, como se adelantó en la sección 5.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

A nuestro parecer, la conclusión más importante de esta tesis, es la demostración operacional de que se pueden emplear las propiedades de los tRNA supresores para obtener mutaciones en elementos celulares que interactúen con esta molécula. Los métodos de selección basados en el principio anterior permitieron obtener candidatos a mutantes ribosomales. Este hallazgo da validez a la orientación inicial propuesta en el Capítulo I, e indica excelentes perspectivas.

El tipo de enfoque mostrado en esta tesis es particularmente importante en este momento, contemporáneo al ataque sistemático de la estructura ribosomal. El ribosoma, aún cuando sea caracterizado totalmente por la estructura de sus componentes, persistirá como una "caja negra" a menos que se defina la participación de éstos en la "función de transferencia" entre los sustratos aminoacil tRNA, m RNA, peptidil t RNA y tRNA deacilado. Las mutaciones ribosomales obtenibles por procedimientos semejantes a los descritos en esta tesis, se espera que modifiquen, sin anular necesariamente, esta función de transferencia. Así se hará más fácil la caracterización de cuál es la función normal correspondiente, y por lo tanto, la de los elementos ribosomales participantes. En cambio, por

las limitaciones inherentes a su principio de aislamiento, los mutantes termosensibles en dichas funciones en general deben anular dicha función de transferencia.

El segundo logro importante de esta tesis, consiste en el establecimiento (casual) de un método de aislamiento de mutantes de supresor. Estos mutantes conducen al dilema siguiente. Si sus propiedades son explicadas de acuerdo a las propiedades conocidas de los tRNA supresores, se hace necesario postular nuevas formas de mutación génica de características distintas a las que ya conocemos. Por otra parte, si las propiedades de estos mutantes se interpretan en base a los mecanismos mutacionales corrientemente aceptados, deben postularse propiedades del tRNA adicionales a las ya conocidas. Esta tesis deja entrever varios caminos para abordar este dilema, nos atrevemos a predecir que cualquier solución a la interrogante planteada conducirá a conocimientos extremadamente interesantes. En todo caso, es otro problema que queda abierto.

CAPITULO VLISTA DE CEPASA.- Cepas Bacterianas canónicas.-

Los símbolos genotípicos usados se describen en la referencia 50.

- E 21 Hrf P₄ X₆, met B, arg UAG-E 21 corresponde a un derivado no lisogénico de E 21 (lambda). Esta cepa se obtuvo del Dr. N Glansdorff, a través de Alain Ghysen.
- X 90 Hfr H, lac Z UAG-X- 90, obtenida de Raúl Goldshmidt (51).
- AB 3113 Hfr AB 313, ilv, thr, leu, rec A, sup D, str A, obtenida del Dr. R. Devoret, a través de Alain Ghysen.
- CS H57B F- ara, leu, lac Y, pur E, gal, trp, his, arg G, mal A; str A. xyl, mtl, ilv met A. B. thi, ton B, sup D, (80)
Obtenida del Dr. J. H. Miller, a través del Dr. Jorge E. Allen de. (52).
- 7003 Hfr H, leu- 3, obtenida de Raúl Goldschmidt.

- WU 36.10 F- leu UAG, tyr UAA, tsx, 80 resistente, lambda resistente. Obtenida del Dr. S. Person a través de Alain Ghysen (13).
- LSS 446 Contiene el episoma F⁺- 14 sup U⁻ . La cepa portadora es rec⁻ .
- 1 4 Hfr H lys, glu A, thi. Obtenida del Dr. P. Starlinger por Alain Ghysen.
- C 600 F- thr, leu, lac y, sup D, ton B, thi. Obtenida de Raúl Goldshmidf.

CEPAS BACTERIANAS CONSTRUIDAS

La base de la denominación es el orden de inscripción en el catálogo. La sigla "SC" significa Santiago de Chile.

- SC 54 F- trp UAG, lac UAG, obtenida como un derivado F- lambda sensible de CA244 (lambda), procedente del Dr. S. Brenner. Esta cepa fué construída por Alain Ghysen, así como sus derivados supresores.

- SC 54.X SC 54 sup X. Los supresores sup D y sup E, sup F, sup C, sup G, sup B y Su⁺ 6 se introdujeron mediante transducción general:

- SC 175 F- leu UAG. Obtenida como un derivado Tyr+, lambda sensible, 80 sensible, estreptomina sensible; de un cruce entre L4 y WU 36.10. Construída por Alain G Ghysen.
- SC 176 F-, tyr UAA
Obtenida de un cruce semejante al indicado para SC 175. Construída por Alain Ghysen.
- SC 178 Hfr H, lac Z UAA-X-90 lam, str A, X-. Obtenida a partir de X90 la mutación lam se derivó buscando un derivado Mal-resistente a lambda. Este derivado X90 lam se mutagenizó con N, N1-dimetil nitroso guanidina seleccionándose un derivado estreptomina resistente. En este paso apareció la auxotrofia X- (no seleccionada). Probablemente es un requerimiento de aminoácido.
- SC 180 Hfr H, lac Z UAA-X-90, met B Arg am E 21, str A. Obtenida cruzando una fenocopia F- de SC179 con E 21, seleccionando recombinantes. Mal +, X+, estreptomina resistentes.
- SC 200 Hfr H leu UAG, met B, arg UAG-E 21 str A. Obtenida transduciendo a prototrofia al lisó-

-geno 7003 (80 p sup F-G 82, UAG 2)
 (el cual tiene una mutación no supresible en leu). usando P1 kc crecido en SC 175. El derivado así obtenido se cruzó con una fenocopia de SC 180, (seleccionando por Lac + y resistencia a estreptomina).

SC 233

Hfr P4 x6, trp UAG, arg UAG-E21,
met B, sup F, Construída por la
 contranstrucción de trp UAG y sup F
 a E 21 (selección Arg+), usando
P1 kc crecido en SC 54 F.

SC 238

Hfr H leu UAG, lac Z UAG- x- 90,
str A. Obtenida de cruzar SC 178
 con una fenocopia de SC 200 (selección Met +, Mal+, X+).

SC 296

F- trp UAG, arg UAG E 21, met B,
sup F, str A, rec A.
 Obtenida de un cruce entre AB3113
 y una fenocopia F- de SC 233, seleccionando recombinantes ilv+,
Thr+, Leu+, estreptomina resistentes. De uno de los derivados
 Rec⁻ así obtenidos se buscó un F- espontáneo. Los criterios de
 ausencia del factor F son a) no transmisión de los marcadores
Thr+ y Leu+ a un derivado rif de
 C600 (selección Thr+, Leu+, resis
 tencia a rifamicina).

b) Resistencia al fago f2
 (específico para machos).
 La construcción de otras las
 cepas se describe en el texto.

CEPAS DE BACTERIOFAGOS

Salvo en los casos indicados, todas las cepas aquí presentadas provienen de la colección de la Universidad de Bruselas, y se obtuvieron a través de Alain Ghysen. Los símbolos genotípicos de lambda se describen en las referencias 53 y 54.

lambda Obtenido de Raúl Goldschmidt
lambda cl Revertante sust de lambda
N-UAG 213; cl.

lambda UAG-P 207

lambda c42, UAG-P 3

lambda: UAG-A 227; cl ts 857

lambda cII; UAG-R 5

lambda UAG-Q 57

lambda cl; UAG- E 43

lambda cII; UAG- R 216

lambda c 2002; UAG-R 221

lambda cII, UAG-Q 203

lambda UAG - N 213; cl

lambda h; UAG- N 7; cl 2035

lambda cII 2038; UAG- O 8

lambda UAG- N 7, 53; cl ts 857; UAG-O 29

lambda imm 434 b p

derivado de lambda imm 434,
seleccionando por placas
grandes, por H. Murialdo.

Lambda UAG - N 213; imm 434, cI 3062Lambda b2; imm 21Lambda imm 21

hy 4

(A hasta J de lambda; att
hasta R de Phi 80)

hy 6

(A hasta att de Phi 80; imm
hasta R de lambda). Es un
revertante UAG+ de hy 6
URG - P3.

hy 64

(hy 6; imm 434, cI 3062; am
N sus 213) derivado de un
cruce entre hy 6 am P sus 3
y, lambda am N sus 213; imm
434; cI 3062.

lambda h 80

(A hasta J de 80; att hasta
R de lambda).

lambda h 80; Δ 9

Obtenido del Dr. J.H. Miller,
(52), a través del Dr. J.E.
Allende.

80 h

Derivado "host range" del an-
terior. Obtenido de la misma
fuente que lambda h 80 9.

80 v

derivado virulento de Phi 80.
Capaz de plaquar en lisóge-
nos para 80. Es termoresis-
tente a 42° C, lo cual lo di-
ferencia de todas las líneas

de 80 que conozco. Obtenido de la misma fuente que lambda h 80, Δ 9.

80 p sup F, UAG 2.

Ver referencia 31. Obtenido de Alain Ghysen.

80 p sup F - A1; UAG 2

Ver Referencia 6. Obtenido de Alain Ghysen.

80 p sup F - U80; UAG 2.

Ver Referencia 6. Obtenido de Alain Ghysen.

80 p sup F- AIU 81 UAG

Ver Ref. 6 Obtenido de Alain Ghysen.

CAPITULO VI

MATERIALES Y METODOS

A) Medios de cultivo.-

1.- Procedencia de los reactivos.- Los medios de cultivo deshidratados, el agar y los colorantes provienen de la casa "Difco". Los aminoácidos, bases, colorantes, vitaminas y antibióticos y el etil-etano sulfonato provienen de la firma "SIGMA". La N-N metil nitroso guanidina proviene de Kock-Light Laboratories y la rifampicina, de Lepetit.

Corrientemente se emplearon diferentes marcas de sales y azúcares, siempre de grado analítico certificado. Los medio y reactivos de prepararon en agua destilada con instrumental de vidrio.

2.- Fórmulas.- Los medios sólidos contienen 1,4% de agar. Los medios suaves para plaqueo de fagos (agar-tapiz o "top agar") contienen 0.7% de agar.

Medio mínimo M 9.- Contiene por litro: 58 gr de Na_2HPO_4 30 gr de $\text{K H}_2\text{PO}_4$, 5 gr. de NaCl, 10 gr de NH_4Cl , 1 mg de clorhidrato de tiamina y 5 gr de azúcar correspondiente. Las sales se preparan a 10 veces su concentración final y se ajustan a pH 7.5 con NaOH. Los azúcares se preparan a la concentración de 10% p/v, y la vitamina al mg/ml. Los ingredientes se autoclavan separadamente y se mezclan antes del uso con la cantidad adecuada de agua estéril (medio líquido) o mezcla estéril de agua y agar (14 gr de agar en 850 ml de agua, para un litro final) en su

punto de ebullición (medio sólido). El medio mínimo sólido puede prepararse sin azúcar, si se desea, agregando ésta como un aditivo sobre las placas solidificadas (ver "aditivos").

Medio rico Triptona.- Contiene por litro: 10 gr. de triptona y 5 gr de Na Cl.

Medio rico 869.- Contiene en 900 ml: 5 gr. de extracto de levadura, 10 gr. de triptona y 5 gr de NaCl. Después de autoclavar se adicionan 100 ml de solución de glucosa estéril al 10% p/v.

Medio rico 853.- es 869 adicionado de KH_2PO_4 (0.3 gr por litro final) y K_2HPO_4 (0.7 gr/litro final). Las sales se mantienen en una solución patrón estéril mil veces concentrada.

Medio rico EMB.- Contiene en 900 ml: 5 gr. de NaCl, 10 gr de triptona, 1 gr de extracto de levadura, 14 gr. de agar, 2 gr de K_2HPO_4 , 0.40 gr de cosina y 0.065 gr de azul de metileno. El fosfato y los colorantes se disuelven separadamente en 100 ml de agua, calentando si es necesario. La mezcla se esteriliza, y antes de usar se funde y se le agregan 100 ml de solución al 10% p/v del azúcar que se desea probar.

Medio para stab.- Contiene por litro: 10 gramos de caldo nutritivo (Nutrient Broth) 5 gr. de NaCl y 6 gr de agar.

Aditivos.- Los aminoácidos se mantienen en soluciones patrón estériles con 5 mg/ml del l-aminoácido, y se usan a una concentración final de 40-50 ug/ml. La estreptomycin se usa a esta misma concentración final. La solución de esta droga no puede ser autoclavada. La rifampicina se usa desde una solución patrón en metanol (10 mg/ml) y se usa a la concentración final de 150- 200 ug/ml. Los azúcares se

preparan en soluciones patrón estériles al 20% p/v y se usan a la concentración final de 0.05% - 0.1% . Los aditivos se pipetean sobre las placas y se esparcen con un "rastriillo" estéril.

3.- Preparación de placas.-

El medio de cultivo, previamente fundido y llevado a ebullición, se deja enfriar hasta 60° C y vierte manualmente en placas de 9 cm de diámetro. Las placas para crecimiento de fagos se llenan con 30 ml de medio. Las demás, corrientemente con 25 ml de medio. Con un poco de práctica se pueden verter placas con menos de un 5% de error en el volumen especificado. Después de solidificados, las placas se almacenan a 4° C y, antes de usar, se secan por 1 hr. a 37° C en un horno de convección forzada.

B.- Métodos de cultivo.-

a) Suspensión de bacterias.- Se centrifuga un cultivo de bacteria, y resuspende en $Mg SO_4$ 10 m M estéril. Esta suspensión se puede almacenar por meses a 4° C. Las diluciones de esta suspensión se realizan en la solución descrita.

b) Lisados de fagos lambdoides.- Se designa como fagos lambdoides a aquellos capaces de eventualmente recombinar con lambda. Este grupo incluye a 80, 434, 21 y los derivados híbridos lambda imm 21, lambda imm 434, hy 4, hy 6, hy 64 lambda h 80, etc.-

1.- Inducción por luz ultravioleta.-

Se centrifuga 5 ml de un cultivo exponencial de lisógenos, y se resuspende en 2 ml de Mg SO_4 10 mM. Se ponen en una placa y se irradian hasta 70- 80% de supervivencia con una lámpara germicida (por ejemplo, "Sylvania" Germicidal Lamp, 15 W). Se diluye 1: 5 en Triptona adicionada de Mg SO_4 hasta una concentración final de 10 mM. Se incuba 180 minutos con agitación, a 37°, se agrega 1-2 gotas de HC CL_3 y se incuba con agitación por 15- 20 minutos adicionales. El lisado se centrifuga y almacena sobre cloroformo, a 0-4° C en tubos herméticos. De esta manera el lisado pierde solo 5- 10% de su título por año de almacenamiento.

2.- Termoinducción.-

Aplicable a derivados cl ts 857 de lambda. Se incuban 20 minutos a 43- 44° C, 5 ml de un cultivo exponencial de lisógeno, obtenido a 32° C. Luego se prosigue la incubación a 37° C por 180 minutos, y el lisado obtenido se procesa como se describió en "Inducción por luz ultravioleta".

3.- Lisados Vegetativos. en Medio Líquido.

Se toma una placa aislada de fago, cortando el "agar Tapiz" en sus alrededores, y se disgrega en 0.2 ml de suspensión de bacterias permisivas. Se permite la absorción del fago por 15 minutos a 37° y se incuba en medio rico adicional de Mg SO_4 hasta la concentración de 10 mM.

Luego se procede como se describió en "Inducción por luz ultravioleta".

4.- Lisados Vegetativos en Medio Sólido.
("Lisados de Placa").-

Se coge mondadientes estéril con pinzas estériles, y se pica una placa aislada de fago. Se deja extraer el mondadientes en 0.5 ml de suspensión de bacterias permisivas durante 15 minutos, a 37° C. Se agregan 2-3 ml de medio líquido, con 10 mM de Mg SO₄ y 3 ml. de agar tapiz fundido. La mezcla se vierte sobre una placa fresca (con menos de 36 hrs. de vertida, y no desecada previamente) de medio sólido. Durante las operaciones anteriores no es necesario extraer el mondadientes, quedando adherido por capilaridad a las paredes del tubo. La placa así preparada se deja incubar por 8-16 hrs. a 37°, con la superficie hacia arriba. Para preparar el lisado se agregan 2 ml. adicionales de medio líquido, con 10 m M de Mg SO₄, a la placa y se deja reposar 1 hr. a 37° C, y luego se traspasa la capa de agar blando y líquido acompañante a un tubo de centrifuga, en condiciones de esterilidad, ayudandose de una espátula de forma apropiada, esterilizada por flameo con alcohol. La mezcla se centrifuga y el sobrenadante se almacena como se indicó en la sección 1.-

5.- Lisados de fago Plkc para Transducción.-

Se toman 5 ml de un cultivo exponencial de la bacterias donantes (5 x 10⁷ células/ml) crecido en 869. Se centrifuga y resuspende en 1 ml de Mg SO₄, 10 m M, Ca Cl₂, 5 mM estéril.

Se infecta con una multiplicidad de 3 - 5 con fago P1 kc y se permite la absorción por 15 minutos. Luego se centrifuga y resuspende en 5 ml de 869 contenido 10 m M de $Mg SO_4$ y 5 mM de $CaCl_2$. Se incuba hasta que se produzca la lisis (No por más de 180 minutos) manteniendo agitación a 37° C. El lisado se procesa como se indicó en "Inducción por luz ultravioleta".

C.- Titulación de fagos.-

1.- Título aproximado.- Se preparan tubos de dilución con 5 ml del medio utilizado para crecer el fago, y una placa de medio rico, con un tapiz de bacterias permisivas preparado con 3-4 ml de "agar- tapiz" y 0.5 ml de suspensión de bacterias. El agar-tapiz" se lleva previamente a ebullición y luego se deja enfriar hasta 5-55° C, Se hacen diluciones seriadas del lisado (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}), tomando en cada caso 0.100 ml en un sector del tapiz. En el tapiz deben quedar finalmente gotas del lisado y de las tres diluciones señaladas, en sectores separados. Después de 16 horas de incubación, se establece el título en base a las placas que crecen en los sectores. El título así obtenido tiene error por un factor de 2-3, e exactitud suficiente para la mayoría de los propósitos prácticos). Esta forma de titular es rápida y requiere poco material.

2.- Título exacto.- Se hacen diluciones adecuadas del lisado, en base al título aproximado, y se mezcla una alícuota conteniendo de 50 a 200

fagos con 0.5 ml de suspensión de bacterias. En el caso de P_1 , la suspensión debe contener además 5 m M $CaCl_2$, se debe permitir la absorción por 15 minutos. La mezcla descrita en cada caso se mezcla con el "agar-tapiz" fundido y se vierte en una placa de medio rico. Después de que esta solidifique se incuba a 37° por 16 horas.

D.- Aislamiento de clones puros, o "clonaje".

1.- Bacterias.- Un clon bacteriano obtenido de un procedimiento de selección cualquiera operacionalmente se considera como genéticamente puro cuando ha pasado, por lo menos por un ciclo de purificación hasta colonias aisladas en condiciones selectivas, y por otro ciclo se mejante en condiciones no selectivas. La purificación se realiza restregando una pequeña cantidad de la bacteria sobre placas del medio adecuado, con un alambre esterilizado a la llama. El tipo de alambre más adecuado es el de platino iridiado de 0.02- 0.03 mm de grosor, aunque puede usarse alambre de Nicrom, Cromel, etc. Pueden hacerse de 15 a 20 purificaciones por placa "standard" (9 cm de diámetro).

2.- Fagos.- Se purifican plaqueando diluciones adecuadas en el tapiz de la bacteria adecuada o bien restregando suavemente una porción del lisado con un alambre de platino de 0.1 mm de grosor (o menor). Así pueden purificar hasta 10 colonias por placa "standard".

E) Examen por replicación de placas.-

Este método es inapreciable para el examen rápido de marcadores. Se realiza sembrando parches de 4 mm en una placa de medio rico, con un alambre estéril embebido en bacterias crecidas en medio sólido, cuidando de dejar una película más o menos uniforme de bacterias. La placa así preparada (con no más de 100 "parches" por placa standard) se incuba hasta que el crecimiento de los parches sea nítido (6 a 16 hrs.), pudiendo entonces ser usada como matriz de replicación. Para esto se imprime en terciopelo estéril extendido en un bloque cilíndrico de tamaño adecuado. Desde el terciopelo pueden sacarse de 5 a 8 réplicas en las placas reveladoras adecuadas. Los trozos de terciopelo (el óptimo es la felpa de lana con pelos de 2 - 3 mm) se cortan en cuadrados de 15 a 18 cm. se lavan con agua corriente y agua destilada (nunca con detergente) y se autoclavan una vez secos, antes de ser usados.

F) Cruces bacterianos.-

1.- Análisis de rutina del carácter H fr.-

En una placa de 853 se siembran parches del H fr a probar, se incuban 4 o 5 horas a 37° C y se replican sobre una placa de medio selectivo adecuado, sembrada con suspensión de la cepa F⁻ adecuada (10⁸ bacterias por placa). La selección de recombinantes debe realizarse para un marcador introducido temprano por el Hfr. La constraselección del macho debe preferentemente realizarse por estreptomycinina o rifampicina para impedir el

crecimiento por sintrofismo.

2.- Cruces Hfr x Hfr. El Hfr receptor se cultiva en 853 (5 ml) con aireación, por 24 hrs obteniéndose así una "fenocopia" F⁻ de este. El Hfr donante se cultiva en 853 hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Con pipetas precalentadas se juntan en un matraz precalentado los cultivos donantes y receptor, en la proporción de 1 volumen de donantes por diez de receptor. Se incuban sin agitar por el tiempo requerido para la entrada del marcador deseado, y se termina el cruce plaqueando la dilución apropiada en medio selectivo. Para permitir la segregación de marcadores de expresión fenotípica lenta (como str A⁻) se diluye la mezcla conjugante en Triptona (1:50 o 1:100) y se incuba hasta saturación.

3. Cruces Hfr x F⁻. Se procede como en caso anterior pero usando como receptor un cultivo exponencial de la cepa F⁻.

4. Cruces por transducción con P1 kc. Se infecta la cepa receptora (en forma de suspensión en 10 mM Mg SO₄ y 5 mM CaCl₂, proveniente de un cultivo en 869 con un lisado de P1Kc obtenido en la cepa donante (10⁹ - 10¹⁰ fagos por ml). Se usa una multiplicidad de infección de 0.1 a 0.01. En la práctica es conveniente lograr la multiplicidad correcta de infección realizando las diluciones de fago directamente en la suspensión de receptores. Se deja adsorber por 15 minutos a 37° C y se siembra en placas selectivas.

G.- Lisogenización de fagos lamboides.

En un "tapiz" de bacteria se deja una gota de dilución de fagos (10^6 fagos por ml) A las 16 hrs. de incubación se pican bacterias de la zona de lisis, y se restriegan hasta lograr colonias aisladas, en una placa de medio rico.

En las colonias aisladas se prueban los marcadores relevantes del fago (inmunidad) supresor) ya sea por replicación de placas o por cruzar una estría del lisógeno purificado sobre una estría perpendicular del fago adecuado. La lisogenización de los derivados ocre de 80 p sup F am sus 2 se hace seleccionando por la entrada del supresor en el lisógeno.

H.- "Cura" de lisógenos para lambda.

En un tapiz de lisógeno se deja caer una gota de dilución de lambda b 2, imm 21 (10^6 g fagos por ml). Se aíslan y purifican las bacterias supervivientes de la zona de lisis, y se prueba su inmunidad haciendo estrías de éstas, cruzando sobre una estría de lambda cl. Las bacterias que resultan no inmunes por esta prueba, se examinan por inmunidad a lambda in mm 21 poniendo gotas de dilución de este fago sobre un tapiz de la bacteria "curada" de lambda. (lambda b 2, imm 21 puede lisogenizar, aunque a baja eficiencia). La eficiencia general del proceso de "cura es mejor que el 50% de los supervivientes analizados.

I.- Inducción en placas de fagos transductores de supresor (11).

Adecuado para examinar por replicación de placas a fagos transductores. Los lisógenos se

siembran en "parches" en una placa de medio rico, se incuban 3 hrs. e inducen por luz ultravioleta, irradiando con una dosis que permita un 70-80% de supervivencias de la cepa silvestre. Se incuban 3 hrs. adicionales y se matan las células su pervivientes colocando sobre la tapa invertida de la placa una "plancheta" (de las de contador de centelleo con flujo de gas) con 1 ml de HC Cl_3 . Sobre ésta se coloca la placa madre y se incuban el conjunto a 37°C por una hora. Luego los fagos se replican a placas selectivas sembradas con 10^8 células reveladoras.

J. Espectro de supresión.-

Las cepas a examinar se inoculan en 0.5 ml de triptona e incuban por la noche. Luego se incuban con agitación por 4 o 5 hrs. más, hasta la saturación del cultivo. Se agregan tres ml de "agar tapiz" fundido, preparado en Triptona. Sobre los tapices se agregan gotas de 0.003 a 0005 ml de diluciones de fago (1×10^6 fagos por ml). Después de que las gotas se han absorbido, se incuban las placas por 16 hrs. a 37°C . Se pueden distinguir cuatro grados de lisis en las zonas infectadas.

a) Lisis total, señalada con (+) en las Tablas.

b) Lisis parcial, en la cual se observan placas aisladas de fago, señalada con el signo (\pm).

c) Lisis pobre, caracterizada por lisis en el límite de la capacidad de detección visual. Frecuentemente el test aparece como negativo en los duplicados. Se señala con el signo (P)

Ausencia de lisis, señalada con el signo (-). El comportamiento del espectro de supresión, señalado en las Tablas 1 y 2, es bastante estable al cambiar la cepa portadora del supresor. El comportamiento de algunos fagos (especialmente sus 221, sus 3, sus 203 y sus 43) puede cambiar manteniéndose el patrón general de crecimiento de los otros fagos, si en la cepa existen mutaciones en Str A y mal A.

K.- Prueba del fenotipo Rec.

1.- Por replicación de placas. Se irradia una replica en medio rico con una dosis de luz ultravioleta que de 70 a 80% de supervivencia en la cepa silvestre y se incuba 16 horas. Las cepas rec A no crecen en esta prueba.

2.- Por estrías.- Se irradia en las condiciones anteriores, una placa donde se han hecho estrías de la cepa a probar, después de cubrir la mitad de la placa con una lámina de cartón, papel, metal etc., de modo que su borde recto que de perpendicular a las estrías. Después de 16 horas de incubación, en las estrías de cepas rec A⁻ no crece (o crecen unas pocas colonias resistentes a la irradiación) la parte irradiada. Esta prueba permite distinguir la presencia o ausencia de rec A⁻ aún cuando la cepa portadora sea lisogénica para fagos lamboides inducibles por luz ultravioleta.

L.- Mutagénesis de bacteria.-

1.- Mutagénesis por N.N¹ metil nitroso guanidina (adaptado de referencia) 5.5.).

Se toma un cultivo de la bacteria a

-tacionaria, crecido en 869, Se centrifuga, resuspende y lava en medio volumen de tampón T M 6 (0.6% tris, 0.06% ácido maleico, 1,1% de $(N H_4)_2 S O_4$, 0.01% Mg $S O_4$, 0.05% de citrato de Na, ajustado a pH 6.0 con Na OH) estéril, por dos veces consecutivas. A dos ml de dicha suspensión se agregan 0.2 ml de solución recién preparada de N-N' metil nitroso guanidina (3 mg por ml). Se deja 15 minutos a 30° C (o p (o por 20 minutos a temperatura ambiente). Se centrifuga y se lava dos veces en TM6, y luego se diluye 1:10 en Triptona, incubándose a 37° C con aireación para permitir la expresión fenotípica de las mutaciones producidas.

2.- Mutagénesis por etil etano sulfonato.-

Se crece un cultivo hasta 2×10^8 células por ml en medio mínimo glucosa. Luego se centrifuga, se lava y resuspende en la mitad del volumen original de medio mínimo sin fuente de carbono, hecho 0.2 M con Tris-sulfato a pH 7.5. Se agregan 0.030 ml de etil etano sulfonato a 2 ml de suspensión y se agita y mezcla vigorosamente. Se cultiva con agitación por dos horas a 37° C. Se diluye diez veces en medio rico y se deja crecer por toda una noche.

M.- Mutagénesis de fagos por N-N' metil nitrosoguanidina.-

Se crecen hasta la parte temprana de la fase de crecimiento estacionario un cul-

-tivo de 5 ml de bacterias permisivas, en 869. Se concentra a 2 ml en $Mg SO_4$ 10 m M y se infecta con bacteriófagos a una multiplicidad de tres fagos por bacteria, dejándolos adsorberse por 15 minutos a 37° C. Se centrifuga y lava dos veces con TM6, y se resuspende en este mismo tampón. Con esta suspensión se procede como se describió en "Mutagénesis de bacteria por N-N' metil nitroso guanidina" resuspendiendo al final en cinco volúmenes de Triptona 10 m M en $Mg SO_4$. Se incuba hasta que se observe lisis. (pero no más de cuatro a cinco horas). Luego se procesa el lisado como se describió en "Inducción por luz ultravioleta".

N.- Determinación de frecuencia de reversión.

Se moja y escurre un alambre de platino en un cultivo de bacterias en medio líquido, y se inocula 2 ml de medio rico fresco puesto en tubos de centrifuga. (El inóculo, hecho de la manera indicada tiene menos de cien células). Se cultiva con agitación por la noche, y se centrifuga, lava y resuspende en el mismo volumen original, o la décima parte de éste, según la frecuencia de reversión de la cepa, previamente medida en un experimento piloto. La suspensión así obtenida se plaquea en medio selectivo titulándose, paralelamente, una alícuota de ésta en medio rico.

B I B L I O G R A F I A

- 1) W.J. Brammar en: Techniques in Protein Biosynthesis 2 , capítulo 1. Academic Press inc. Editado por Campbell, P.N. y Sargent, J.R.
- 2) Jorge E. Allende: Biosíntesis de Proteínas y el Código Genético. Monografía # 10 O.E.A. 1972. p. 22.
- 3) Chapeville, F; Lipmann, F; Ehrenstein, G; Wersplum, B; Ray, W.J. y Benzer, S.: Proc: Nat. Acad. Sci. USA 48, 1086 (1962).
- 4) Smith, J.D. y Celis J.E.. Nature New Biol. 243, 66 (1973).
- 5) Celis J.E.; Hooper M.L. y Smith J.D.: Nature New Biol. 244, 261 (1973).
- 6) Ghysen, A. y Celis J.E.: J. Mol. Biol. 83, 333 (1974).
- 7) Inokuchi, H; Celis J.E., Smith, J.D.: J. Mol. Biol. (1974) en prensa.
- 8) Person, S. y Osborn, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 60, 1030 (1968).
- 9) Ohlsson, B.M.; Strigini, P.F. y Beckwith J.R.: J.Mol. Biol. 36, 209 (1968).
- 10) Hirsh, D. J. Mol. Biol. 58, 439 (1971).

- 12) Högenauer, G. : Febs Letters 39, 310 (1974).
- 13) Yahata, H; Ocada, Yy Tsugita. A.: Molec. Gen. Genetics 106, 208 (1970).
- 14) Rosset, R y Gorini, L.: J. Mol. Biol. 39, 95 (1969).
- 15) Gorini L.: Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 34, 101 (1969)
- 16) Strigini, P y Gorini, L.: J. Mol. Biol. 47, 517 (1970).
- 17) Strigini, P y Brickman, E. J. Mol. Biol. 75, 659 (1973).
- 18) Maisurian. A.N. y Buyanovskaya, E.A.: Molec. Gen. Genetics 120, 227 (1973).
- 19) Hooper, M.L.; Russel, R.L. y Smith J.O.: Febs Letters 22, 149 (1972).
- 20) Russel, R.L.; Abelson J.N.; Landy. A; Gefter. M.L.; Brenner S. y Smith J.D.: J. Mol. Biol. 47, 1 (1970).
- 21) Altman, S. y Smith, J.D. Nature New Biol. 233, 35 (1971).
- 22) Ghysen, A. y Ceñis J.E., Nature (1974) en prensa.
- 23) Garen, A; Garen, S. y Wilhelm, R.C.: J. Mol. Biol. 14, 167 (1965).

- 24) Ghysen, A. Comunicación personal
- 25) Ikeda, H: Nature New Biol. 47, 15 (1970)
- 26) Smith, J.D.; Barnett, L.; Brenner, S. y Russel R.L. J. Mol. Biol. 54, 1 (1970).
- 27) Celis, J.E., Hooper, M.L. y Smith, J.D. Nature New. Biol. 244, 261 (1973).
- 28) Altman, S; Brenner, S. y Smith, J. D. J.Mol. Biol. 56, 195 (1971).
- 29) Krieg, R.H. y Stent G.S.: Molec. Gen. Genetics 103, 274 (1968).
- 30) Krieg, R.H. y Stent, G.S. Molec. Gen. Genetics 103, 294 (1968).
- 31) Andoh, T. y Ozeki, H: Proc. Nat. Acad Sci. USA 59, 792 (1968).
- 32) Gorini, L. Ann. Rev. Genet. 4, 107 (1970)
- 33) Jedlicki, E. Unidad de investigación 1973. 4º trimestre. Doctorado en Ciencias, U. de Ch. Programa de Bioquímica.
- 34) Abelson, J.N., Gefter, M.L.; Barnett, L.; Landy, A.; Russel, R.L. y Smith, J.D. J. Mol. Biol. 47, 15 (1970).
- 35) News & Views Nature 223, 1307 (1969).
- 36) Pironio, M. y Ghysen, A. Molec. Gen. Genetics

- 37) Ghysen, A. y Pironio. M. J. Mol. Biol. 65, 259 (1972).
- 38) Georgopoulos C.P. en "The Bacteriophage Lambda" pl 639 ed. por A.D. Hershey C.S.H. Lab. 1971.
- 39) Georgopoulos C.P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68 2977 (1971).
- 40) Friedman, D.I. en "The Bacteriophage Lambda" p. 733 ed. por A.D. Hershey C.S.H. Lab. 1971.
- 41) Siegel. E.C. y Bryson, V. J. Bacteriology 94, 38 (1967).
- 42) Arber, W. en "The bacteriophage Lambda" p. 83 ed. por A.D. Hershey C.S.H. Lab. 1971.
- 43) Mc. Clintock, B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 36, 344 (1950)
- 44) Mc Clintock, B. Cold Spring Harb. Sym. Quant. Biol. 21, 197 (1956).
- 45) Reyes, O. Tesis de Exámen Intermedio. Doctorado en Ciencias, Programa de Bioquímica, Universidad de Chile, 1973.
- 46) Hirsch, A, Starlinger, P. y Brachet. P. Mol. Gen. Genetics 119, 191 (1972).
- 47) Fiandt, M; Szybalski, W. y Malamy, H.M. Molec. Gen. Genetics 119, 223 (1972).
- 48) Michaelis, G.; Saedley H.; Venkov, P. y Starlinger. P. Mol. Gen. Genetics 119, 266

- 49) Malamy, H.M. "The Lactose Operon" p. 359
Ed. por J.R. Bec. Kwith y D. Zipser C.S.
H. Lab. 1970.
- 50) Taylor, A.L. y Trotter, C.D. Bacteriological
Reviews 36, 504 (1972).
- 51) Goldschmidt R. Nature (London) 228, 1151
(1970).
- 52) Miller, J.H. "Experiments in Molecular Genetics"
Cold. Spring Harbor Laboratory, 1971.
- 53) Szybalski, W.; Bovre, K.; Fiandt, M.; Hayes, S.;
Hradecna, Z.; Kumar, S.; Loyeron, M.A.; Nükamp,
H. y Stevens, W.F. Cold Spring Harb. Symp. Quant.
Biol. 35, 341 (1970).
- 54) "The bacteriophage Lambda" capítulos 1 al 15.
Ed. por A.D. Hershey. Cold Spring Harbor Lab.
1971.
- 55) Adalberg, E.A.; Mandel, M. y Chein- Ching- Chen,
G. Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 788 (1965).
-