

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA CIENCIAS
29-X-74
ENTRADA N.º 350

T9/505

MECANISMOS DE ACCION DE LA NITROSOGUANIDINA SOBRE EL
CROMOSOMA DE ESCHERICHIA COLI

Trabajo realizado por Natalia Guerola Carpi,
Licenciada en Ciencias, para optar al grado de
Doctor en Ciencias por la Universidad de Sevilla,

Natalia Guerola Carpi
Sevilla, Octubre de 1974

Director y Ponente

Manuel Losada Villasante

Dr. Manuel Losada Villasante

Director del Departamento de Química Fisiológica

INDICE DE MATERIAS

RESUMEN Y CONCLUSIONES	5
AGRADECIMIENTOS	8

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Enzimología de la replicación del ADN	10
1.2 Nitrosoguanidina y mutagénesis	20
Propiedades de la nitrosoguanidina	22
Estabilidad de la nitrosoguanidina	22
Reacciones de la nitrosoguanidina	23
Acción de la nitrosoguanidina sobre el ADN	24
Reacciones de la nitrosoguanidina con las proteínas.....	26
Mecanismo de la acción mutagénica de la nitrosoguanidina	27
Tipos de mutaciones causadas por la nitrosoguanidina	30
Especificidad de los mutagenos	30

CAPITULO II

COMUTACION CON NITROSOGUANIDINA

2.1	Supervivencia de <u>E. coli</u> SE1 después del tratamiento con nitrosoguanidina	33
2.2	Cinética de la expresión de mutaciones Azi ^r inducidas por nitrosoguanidina	34
2.3	Distribución de requerimientos auxótroficos entre las colonias azi	38
2.4	Mutagenesis en una población con la replicación detenida a término	43
2.5	Reciprocidad de la comutación	44

CAPITULO III

ALEATORIEDAD DE LAS MUTACIONES INDUCIDAS

CON LUZ ULTRAVIOLETA

3.1	Supervivencia de <u>E. coli</u> SE1 y SE35 al tratamiento con luz ultravioleta	49
3.2	Cinética de la aparición de mutaciones tras el tratamiento con luz ultravioleta	54
3.3	Distribución de las mutaciones inducidas por luz ultravioleta	56

CAPITULO IV

ALEATORIEDAD DE LAS MUTACIONES PRODUCIDAS

CON SULFONATO ETILMETILICO

4.1	Supervivencia de SE1 y SE35 al tratamiento con sulfonato etilmetílico	63
-----	---	----

4.2	Cinética de la aparición de mutaciones tras el tratamiento con sulfonato etilmetílico	68
4.3	Distribución de las mutaciones inducidas por sulfonato etilmetílico	71

CAPITULO V

EFFECTO DE LA NITROSOGUANIDINA SOBRE UN MUTANTE

PRODUCTOR DE POLIMERASA III TERMOSENSIBLE

5.1	Crecimiento en medio mínimo	75
5.2	Curva de crecimiento siguiendo el tratamiento con nitrosoguanidina	76

CAPITULO VI

DISCUSION

6.1	Comutación	84
6.2	Distribución aleatoria de las mutaciones inducidas por luz ultravioleta y sulfonato etilmetílico	90
6.3	Mecanismo de acción de la nitrosoguanidina	91

APENDICE

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

A.	ESTIRPES BACTERIANAS	96
B.	TAMPONES	98

C.	MEDIOS DE CULTIVO	100
D.	PRODUCTOS QUIMICOS	102
II. METODOS		
1.	CRECIMIENTO DE CULTIVOS	103
	(A) Cultivos en medio liquido	103
	(B) Cultivos en medio sólido	104
2.	TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA	
	(A) Preparación de la solución de nitrosoguanidina	105
	(B) Mutagenesis con nitroso- guanidina	105
3.	TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA	106
4.	TRATAMIENTO CON SULFONATO ETILMETILICO	107
5.	OBTENCION DE MUTANTES	108
	(A) Selección de mutantes por el método de penicilina	108
	(B) Obtención de mutantes con nitrosoguanidina	109
6.	REVERSION DE MUTACIONES	111
7.	AISLAMIENTO DE AUXOTROFOS	112
8.	SINCRONIZACION DE CULTIVOS.....	114
	BIBLIOGRAFIA	116

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina mutageniza preferentemente a los genes en replicación, según se dedujo del estudio de la inducción de mutaciones a lo largo del ciclo celular en poblaciones sincronizadas. Esta tesis se propone: a) puntualizar la longitud de los segmentos cromosómicos especialmente sensibles y la frecuencia de mutaciones múltiples en esos segmentos; b) descubrir si otros agentes mutagénicos presentan la misma propiedad; c) investigar las causas del fenómeno.

Se ha llegado a las siguientes conclusiones:

(1) La zona particularmente sensible a la nitrosoguanidina, situada próxima al punto de replicación en el momento del tratamiento, tiene una longitud de 1.5 a 2 minutos del mapa genético de Escherichia coli, o sea, del orden de 50 a 100 genes de tamaño medio. En tales zonas se encuentran más del 80% de las mutaciones inducidas por la nitrosoguanidina.

(2) La probabilidad de mutar simultáneamente dos genes (comutación) decrece con la distancia que los separa en forma aproximadamente lineal. Si la nitrosoguanidina ha inducido una mutación en un gen, la probabilidad de que induzca una mutación a 0.5 minutos de distancia, detectable como auxotrófica, es aproximadamente del 1% por gen.

(3) La luz ultravioleta y el sulfonato etilmetílico no presentan una tendencia a mutar simultáneamente genes vecinos similar a la de la nitrosoguanidina; por tanto sus mecanismos de acción mutagénica deben ser distintos. Tanto la luz ultravioleta como el sulfonato etilmetílico son agentes apropiados para obtener mutantes, sobre todo cuando deba evitarse que el mutante obtenido presente otras mutaciones cercanas.

(4) La acción mutagénica de la nitrosoguanidina exige la existencia de un sistema replicador activo: la nitrosoguanidina induce muchas más mutaciones a la temperatura permisiva que a la restrictiva en un mutante dnaE que produce una polimerasa III del ADN termosensible. Este efecto no se encuentra cuando utilizamos un revertiente con polimerasa III normal.

(5) Se propone que la nitrosoguanidina altera al mecanismo de replicación (polimerasa III del ADN) induciéndole a error en su acción sobre la síntesis de ADN, hasta que es reemplazado por otra copia inalterada de la enzima.

a mi madre.

Mi mayor agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado en la realización de esta tesis haciendo posible al mismo tiempo una labor investigadora y formativa:

Al Profesor E. Sánchez-Monge, en cuyo laboratorio del I.N.I.A. comencé mis primeras tareas investigadoras.

A E. Cerdá Olmedo, del cual el entusiasmo y capacidad de trabajo científico, es un constante estímulo para todos.

Al Profesor Manuel Losada, que me ayudó y orientó en todo momento siendo ejemplo para todos de laboriosidad y organización.

Al Dr. Philip C. Hanawalt, que me dió la oportunidad de trabajar en su laboratorio de Biofísica de Stanford, donde comenzaron estos trabajos.

Al Dr. Frederick Kasten, cuya personalidad científica y humana fue un estímulo siempre.

Las discusiones, sugerencias y cooperación de los Profesores J.L. Ingraham y Gordon Lark fueron esenciales en la consecución de este trabajo.

Finalmente a todos mis compañeros de trabajo que compartieron los momentos buenos y los malos en el laboratorio y especialmente a Bonnie Walters, trabajadora infatigable que mecanografió con la mayor dedicación la parte definitiva de esta tesis.

INTRODUCCION

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Enzimología de la replicación del ADN.

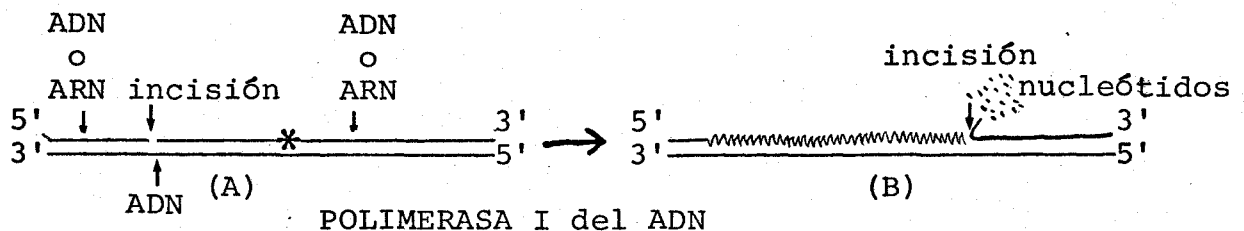
Durante muchos años la polimerasa I (llamada a veces coloquialmente enzima de Kornberg) fue la única enzima conocida en Escherichia coli capaz de replicar ADN. Esta enzima, formada por una sola cadena polipeptídica de peso molecular 109,000 cataliza "in vitro" varias reacciones diferentes:

Actividad polimerasa. Requiere ADN además de los trifosfatos de los cuatro desoxinucleósidos y cataliza la adición de nucleótidos al extremo 3'-OH del ADN preexistente con liberación de pirofosfato (polimerasa 5'→3'). No acepta como modelo moléculas perfectas de ADN uncatenar o bicatenar, pero sí ADN parcialmente bicatenar (una cadena larga de ADN, apareada con otra más corta o "cebo" que puede ser un oligonucleótido de ADN o ARN) o ADN bicatenar que contenga alguna incisión (es decir discontinuidad de la cadena de fosfato y ribosa).

Actividad exonucleasa. Rompe el enlace fosfodiéster de la cadena fosfato-ribosa, separando sucesivamente nucleótidos situados en el extremo 3' (exonucleasa 3'→5') o en el extremo 5' (exonucleasa 5'→3'). Es capaz de hidrolizar in vitro los dímeros de timina; como estos son un producto importante de la acción de la luz ultravioleta, se puede pensar que la enzima podría participar en la reparación del ADN in vivo.

La actividad exonucleasa 3'→5' es la actividad opuesta a la polimerasa, pero la actividad exonucleasa 5'→3' es significativamente distinta. La enzima puede descomponerse por medio de proteasas en dos fragmentos, uno de peso molecular 76,000 que conserva la actividad polimerasa y la actividad exonucleasa 3'→5' y otro de peso molecular 36,000 que contiene la actividad exonucleasa 5'→3'. El fragmento mayor contiene el extremo carboxilo del polipéptido original y el menor, el extremo amino (Klenow y Henningsen, 1970; Brutlag et al., 1969).

La acción simultánea exonucleasa y polimerasa permite a la polimerasa I actuar sobre moléculas de la estructura del ADN en presencia de los cuatro trifosfatos desoxinucleótidos, según el siguiente esquema:



Esta forma de acción tiene poco sentido para replicar normalmente el ADN, pero sería muy útil para repararlo. En efecto, si el signo * del esquema A representara una alteración química (por ejemplo un dímero de timina), la alteración habría desaparecido con la actuación de la polimerasa I. La obten-

ción de la estructura A exigiría la acción previa de una endonucleasa cerca del lugar dañado y la reparación completa de la estructura B exigiría la acción de una ligasa uniendo los extremos 3' y 5'. Enzimas de ambos tipos han sido aisladas de diversas fuentes.

En 1969 De Lucia y Cairns aislaron un mutante de E. coli (polA1) que tiene un nivel muy bajo de polimerasa I, del orden del 1% del existente en estirpes normales. Este mutante vive perfectamente, sin alteraciones obvias en su replicación, pero es extraordinariamente sensible a la luz ultravioleta y a otros agentes letales. Se pensó por tanto que la polimerasa I tiene como función primordial la reparación de lesiones al ADN, pero que (al menos la mayor parte) no es esencial en la replicación.

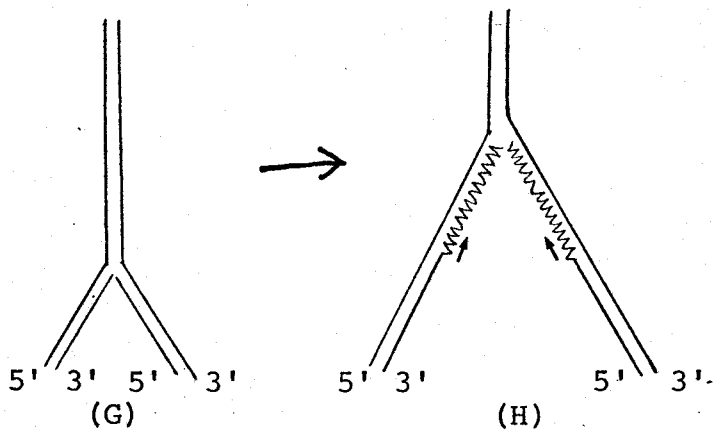
En mutantes polA se encuentran con facilidad otras dos polimerasas del ADN, que en tipos silvestres son enmascarados por la actividad de la polimerasa I.

La polimerasa II tiene un peso molecular aproximado de 120,000 y cataliza una actividad polimerasa 5'→3' y la actividad opuesta, exonucleasa 3'→5'. Como carece de actividad exonucleasa 5'→3' no puede convertir la estructura A en la B, en el esquema anterior. Es muy eficaz, sin embargo, en la conversión de la estructura C en la D, en presencia de los trifosfatos de los cuatro desoxinucleósidos, particularmente si el hueco no es muy grande.

merasa III termosensible, por lo que esta enzima debe ser producto del gen dnaE (Geftter et al., 1971) (para el que recientemente se ha propuesto la designación polC). Los demás genes dna no afectan a las propiedades de las polimerasas y deben codificar otras proteínas esenciales para la iniciación o el mantenimiento de la replicación.

Se cree por tanto que la polimerasa III es la responsable de la replicación normal del cromosoma.

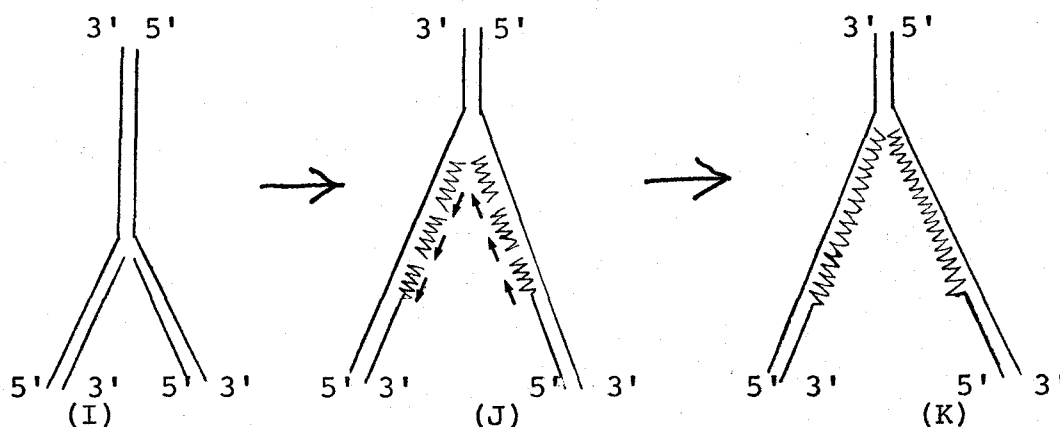
Todas las polimerasas citadas replican el ADN en la dirección 5'→3', pero la replicación del cromosoma bacteriano avanza simultáneamente en ambos sentidos, ya que la célula no contiene cantidades significativas de ADN uncatenar. Los esquemas G y H indican cómo la replicación bicatenar exige síntesis en ambos sentidos.



Se dió un paso importante en la interpretación de esta contradicción cuando Okazaki et al. (1970) demostraron que el ADN recién sintetizado se encuentra en

forma de cadenas cortas, de unos 4,000 nucleótidos de longitud, que posteriormente se unen covalentemente al ADN preexistente por mediación de la ligasa de los polinucleótidos (Okazaki et al., 1970).

Según esta interpretación, cabe sustituir los esquemas G y H anteriores por los esquemas I, J y K

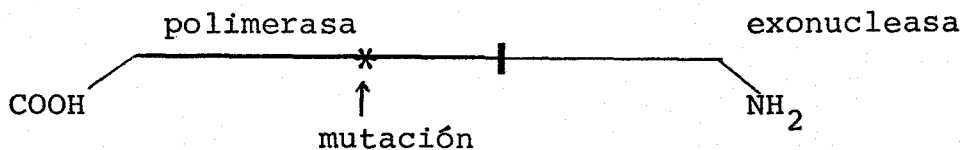


en los que se observa que la síntesis avanza siempre en la dirección $5 \rightarrow 3'$, a nivel molecular.

Los mutantes polA conocidos unen muy lentamente los fragmentos de Okazaki al ADN preexistente de modo que la vida media de estos fragmentos es del orden de diez minutos mientras que en el tipo silvestre es de menos de un minuto. Se sospecha, por tanto, que la polimerasa I participa, juntamente con la ligasa, en la unión de los fragmentos de Okazaki. De hecho, Konrad y Lehman (1974) aislaron un mutante letal condicional para la polimerasa I que a la temperatura restrictiva no es capaz de juntar fragmentos de Okazaki, ni

presenta actividad polimerasa I detectable. Ambos caracteres, la letalidad condicional y la incapacidad para juntar fragmentos de Okazaki, son contrasducidos por el fago P1 junto con el gen metE (Olivera y Bonhoeffer, 1974).

No ha dejado de llamar la atención el hecho de que los mutantes polA conocidos contengan una actividad polimerasa I residual correspondiente a varias moléculas de enzima por célula. Más sorprendente aún es el hallazgo de que tales mutantes contienen una actividad exonucleasa 5'→3' prácticamente normal (Lehman y Chien, 1973). Como las mutaciones polA conocidas son suprimibles por supresores de señales de terminación (Gross y Gross, 1969) se cree que las mutaciones aisladas consisten en la introducción de señales de terminación prematura en la parte final del polipéptido, con lo que la parte anterior, que posee actividad exonucleasa 5'→3', sigue activa, y la parte final, que tiene actividad polimerasa I, es inactiva salvo por un bajo nivel de supresión espontánea:



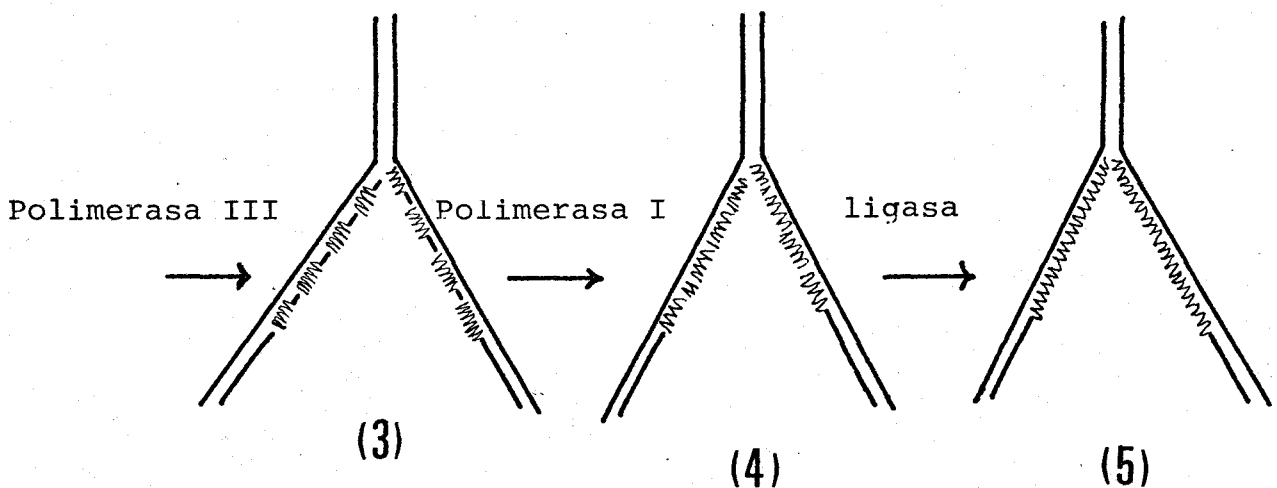
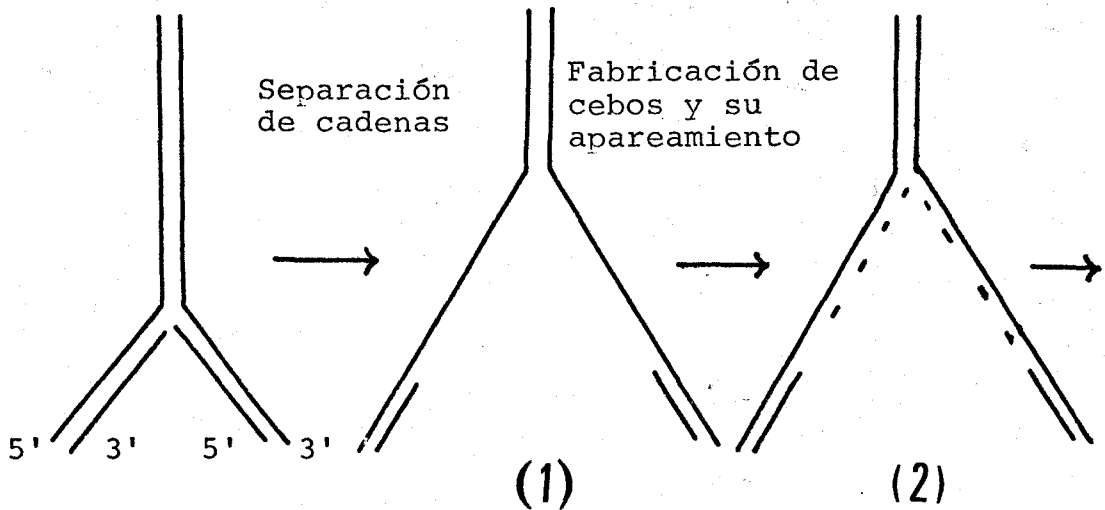
POLIMERASA I

Cabe por tanto esperar que el producto del gen polA fuera esencial para la célula y, efectivamente, Olivera y Bonhoeffer (1974) y Konrad y Lehman (1974) han aislado hace poco mutantes termosensibles polA que a la temperatura restrictiva son incapaces de replicar su ADN y además no poseen actividad exonucleasa 5'→3' ni polimerasa I.

Finalmente, todas las polimerasas conocidas del ADN requieren como sustrato moléculas bicatenales aunque sólo sea por unos pocos nucleótidos ("cebo") de ADN o ARN. Se ignora si tales cebos existen "in vivo" dentro de la célula, pero es posible que sean fabricados (con secuencias aleatorias de cuatro o cinco bases) por la enzima fosforilasa de los ribonucleótidos, cuyo descubrimiento valió el premio Nobel a Severo Ochoa (Grunberg-Manago y Ochoa, 1955). La polimerasa I sería entonces esencial para degradar el cebo de ARN mediante su actividad exonucleasa 5'→3'.

Una interpretación de los resultados experimentales en cuanto a replicación del ADN y función de las polimerasas sería el siguiente: (1) Las cadenas se separan posiblemente debido a la acción de una proteína tipo ω que conduciría al desenrollamiento de la cadena de ADN superenrollada (probable candidato la proteína copol III* asociada a la polimerasa III*); (2) Una enzima como la de la fosforilasa fabricaría oligonucleótidos de pocas bases que actuarían como "cebo", pegándose

a ambas cadenas del ADN ya desenrollado; (3) La polimerasa III* actuaría sobre este cebo uniéndose por el extremo 3' y sintetizando ADN en la dirección 5'→3'; (4) Los cebos serían sustituidos por síntesis nueva mediante la enzima polimerasa I; (5) Una ligasa se encargaría de unir los trozos de síntesis nueva a la cadena antigua mediante el enlace 3'-hidroxil-5'fosfato.



1.2 Nitrosoguanidina y mutagénesis.

La replicación del cromosoma de Escherichia coli ha sido estudiada por medios fisiocoquímicos basados en el uso de isótopos radioactivos y gradientes de densidad (Meselson y Stahl, 1958; Maaløe y Hanawalt, 1964; Lark, Repko y Hoffman, 1963; Cairns, 1963). A partir de estos trabajos se supo que cada uno de los círculos de replicación del cromosoma se inicia en un sitio único y más recientemente otros grupos han tratado la localización de dicho sitio y la dirección de la replicación (Abe y Tomizawa, 1967, 1971; Wolf et al., 1968; Caro y Berg, 1968, 1969; Helmstetter, 1968; Cerdá Olmedo, Hanawalt y Guerola, 1968, etc.). La posibilidad de que la replicación del cromosoma fuera bidireccional y se originara cerca del gen ilv fue apuntada por Caro y Berg (1968) y más tarde comprobada, en cuanto a bidireccionalidad, por Masters y Broda (1971), y en cuanto a origen y término por Bird y colaboradores (1972).

Una nueva forma de abordar el problema de la replicación apareció con el descubrimiento de que la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (que en adelante, para abreviar, llamaremos nitrosoguanidina) causa mutaciones preferentemente en el punto de replicación, o, mejor dicho

en las zonas del cromosoma de Escherichia coli sobre las que incide el complejo enzimático responsable de la replicación del cromosoma (Cerdá Olmedo, Hanawalt y Guerola, 1968). Estos autores aplicaron su descubrimiento al estudio del momento del ciclo celular en que se replica cada gen y de varios aspectos de la regulación de la replicación. Muchos otros investigadores lo han seguido aplicando al estudio de estos problemas en E. coli (Ward et al., 1969; Holhfeld y Vielmetter, 1973), en otras bacterias (Jyssum, 1969) y en levaduras (Dawes, I.W. y Carter, L.A., 1974).

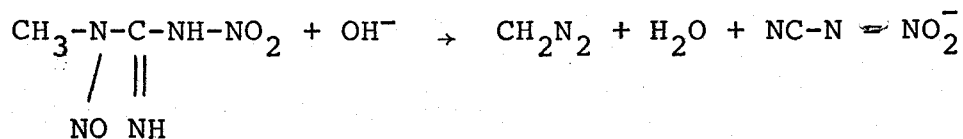
A nosotros, sin embargo, nos atrajeron más otras cuestiones relacionadas con el mismo efecto, tales como la de la longitud del segmento cromosómico afectado, si se producen mutaciones ligadas en dicha zona y el mecanismo detallado de acción de la nitrosoguanidina. Esporádicamente se han encontrado (Hirota et al., 1968; Calendar, 1970; Ames, 1971) casos aislados de mutaciones dobles después del tratamiento con nitrosoguanidina. Si tales mutaciones dobles fueran muy frecuentes y en genes próximos, como cabe esperar de su acción sobre la región en replicación, este agente mutagénico tendría graves dificultades en su empleo para aislar determinados mutantes. Decidimos, pues, abordar experimentalmente el tema de si se producen mutaciones dobles ligadas en la región de replicación como cuestión fundamental para averiguar el modo de acción de la nitrosoguanidina.

PROPIEDADES DE LA NITROSOGUANIDINA

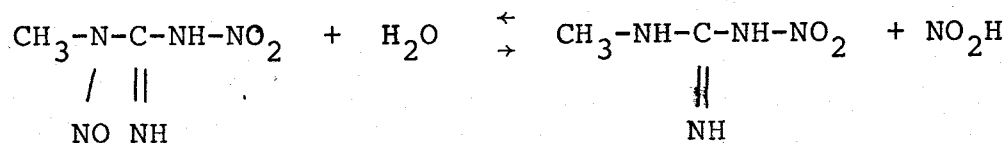
La nitrosoguanidina fue obtenida sintéticamente in 1947 por McKay y Wright. Más tarde los "Cancer Chemotherapy National Service Screening Laboratories" (U.S.A.), haciendo una serie de pruebas de drogas contra el cáncer, encontraron que inhibía tumores ascíticos e incluso prolongaba la vida de los animales afectados (Goldin et al., 1959; Greene, 1964; Greenberg, 1960). Sin embargo, algunos otros grupos demostraron que la misma droga inducía cáncer en animales sanos (Druckrey et al., 1966; Schoental et al., 1966; Sugimura et al., 1966). En 1960 Mandell y Greenberg introdujeron el uso de la nitrosoguanidina en bacterias (E. coli) y descubrieron sus propiedades mutagénicas, empleándose desde entonces rutinariamente en el laboratorio para obtención de mutantes.

ESTABILIDAD DE LA NITROSOGUANIDINA

La nitrosoguanidina cuando se encuentra en solución alcalina (desde pH 5 hasta pH 8) se descompone espontáneamente dando el gas diazometano (McKay, 1948; McKay et al., 1950) según la reacción:



donde se produce, además del diazometano, nitrocianamida, que queda en la solución acuosa. Sin embargo a pH <5 se produce la siguiente reacción (Mandell y Greenberg, 1960):

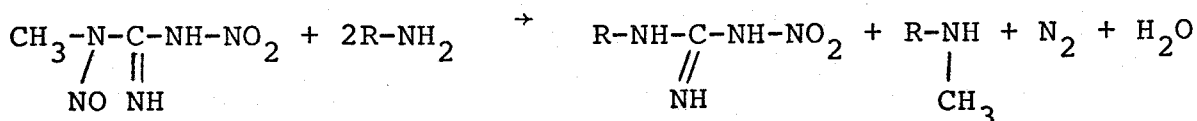
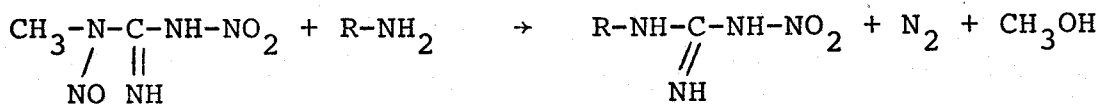


La nitrosoguanidina también se descompone por la luz desprendiendo óxidos de nitrógeno (McKay, 1948).

Al perderse el grupo nitroso, por cualquiera de estas reacciones, desaparece la absorción a 400 nm, y, por tanto, la medida de esta absorción es una buena medida de la pureza del producto. Además este grupo es el más reaccionable de la nitrosoguanidina y el responsable de su acción mutagénica, por lo menos en su mayor parte (Koshinuma et al., 1970).

REACCIONES DE LA NITROSOGUANIDINA

La nitrosoguanidina reacciona con las aminas primarias (McKay, 1949, 1952) dando derivados nitroguanidínicos y derivados metilados.



Estas reacciones han sido observadas con muchas aminas primarias diferentes pero la única amina secundaria que reaccionó con la nitrosoguanidina para dar la reacción de adición correspondiente fue la dimetilamina (McKay, 1949).

La nitrosoguanidina tiene una fuerte acción metilante (Druckrey et al., 1966; McCalla, 1968; Süßmuth y Lingens, 1969; Haerlin et al., 1970; Lawley y Thatcher, 1970) pero se debate si ésta se debe siempre a la acción de su producto de descomposición, el diazometano, que se emplea mucho en química como agente metilante (Zollinger, 1961; Overberger et al., 1966). Hace mucho tiempo que se observó la metilación del grupo amino de la anilina por nitrosoguanidina en condiciones en que el diazometano no podría hacerlo (Henry, 1950). Más adelante veremos una demostración mejor de que la nitrosoguanidina tiene una acción metilante propia.

ACCION DE LA NITROSOGUANIDINA SOBRE EL ADN

La acción metilante de la nitrosoguanidina sobre los ácidos nucleicos ha sido objeto de muchos estudios (McCalla, 1968; Lawley, 1968; Craddock, 1969; Loveless, 1969), revisados por Lawley y Thatcher (1970). Se ha estudiado la acción metilante de la nitrosoguanidina "in vitro" e "in vivo", y se ha comparado con la del

sulfato dimetílico, un agente fuertemente metilante al que no se ha encontrado acción cancerígena. Se ha encontrado que el tratamiento con nitrosoguanidina metilaba abundantemente los ácidos nucleicos, dependiendo de la presencia de tioles (glutati6n o N-acetilcisteína); además metila a las proteínas pero en mucha menor proporción que al ADN. La metilación por el sulfato dimetílico no depende del contenido en tioles y afecta por igual al ADN que a las proteínas.

Chandra et al. (1967) demostraron la incorporación de radioactividad proveniente de nitrosoguanidina tritiada en ARN transferente y polinucleótidos. Se han encontrado además, derivados metilados de todas las bases menos de la timina (McCalla, 1968; Lawley, 1968; Craddock, 1969), siendo los más abundantes 7-metil-guanina y 3-metil-adenina. Los productos de la metilación son diferentes según el ADN sea de cadena doble o sencilla (acción protectora de los puentes de hidrógeno).

Otras reacciones importantes de la nitrosoguanidina con los ácidos nucleicos son la despurinación (pérdida de purinas, que puede dar lugar a roturas del ADN) y la desaminación (Chandra et al., 1967; Craddock, 1969). La desaminación de la adenina da hipoxantina, que se comporta como guanina en los apareamientos entre bases y da lugar a errores de traducción en la síntesis de proteínas (Lingens et al., 1966).

Lingens et al. (1971) demostraron que si se marca con deuterio el grupo metilo de la nitrosoguanidina, este grupo se transfiere íntegro al ADN, ya que se encuentra 7-trideuteriometil-guanina, y por tanto es imposible que provenga del diazometano, que sólo tiene dos átomos de hidrógeno. Concluyeron que la nitrosoguanidina es de por sí un agente metilante.

Los mismos autores demostraron también que la metionina incrementa la metilación del ADN por nitrosoguanidina, sugiriendo que no sólo se transfiere el grupo metilo de la nitrosoguanidina a los nucleótidos, sino también el grupo metilo de la metionina (Lingens et al., 1971).

El tratamiento con nitrosoguanidina del ADN transformante de Bacillus subtilis conduce a su inactivación (Terawaki y Greenberg, 1965; La Polla et al., 1972).

REACCIONES DE LA NITROSOGUANIDINA CON LAS PROTEINAS

Ya hemos indicado al hablar de las reacciones generales de la nitrosoguanidina que reacciona con las aminas primarias. Skinner et al. (1960) aislaron N-nitroamidinolisina como producto de la reacción entre la nitrosoguanidina y la lisina. Schoental (1966) demostró también su reacción con grupos sulfidrilo de las proteínas a pH neutro.

Sugimura et al. (1968) prepararon nitrosoguanidina marcada con C^{14} en el grupo guanidino o en el grupo metilo y trataron varias proteínas (histonas, citocromo c, ribonucleasa, globulina) y también ADN, ARN, poli-A y poli-U. El grupo guanidino se incorporaba preferentemente a las proteínas. En cambio el grupo metilo pasaba al ADN pero no prácticamente a las proteínas. La incorporación del grupo guanidino a las proteínas era diez veces mayor que la del grupo metilo al ADN. Nagao et al. (1969) y Lawley y Thatcher (1970) demostraron que la nitrosoguanidina metila también a las proteínas, aunque en menor proporción que al ADN.

En E. coli y en células de mamífero expuestas a la acción de nitrosoguanidina, se inhibe la síntesis de proteínas, como se ve por el decrecimiento de la incorporación de aminoácidos radioactivos (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967; Anderson y Burdon, 1970).

MECANISMO DE LA ACCION MUTAGENICA DE LA NITROSOGUANIDINA

La acción metilante de la nitrosoguanidina depende del pH (McCalla, 1968, Lawley, 1968; Craddock, 1969) de manera parecida a como la mutagenicidad depende del pH (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968). Se han pensado meca-

nismos detallados por los que la metilación podrá originar mutaciones. La guanina, metilada en el oxígeno unido al carbono 6, causaría errores en la replicación del ADN, poniendo timina en vez de citosina o no poniendo nada en su lugar, lo cual causaría una delección (Loveless, 1969). Además la metilación del nitrógeno 7 debilitaría el enlace de la desoxirribosa con la base y conduciría a la pérdida de purinas (despurinación) que podría también causar errores en la replicación o en la reparación del ADN.

Sin embargo, la metilación de los ácidos nucleicos por nitrosoguanidina no puede ser responsable directa de las mutaciones. Singer y Fraenkel-Conrat (1969) encontraron que la metilación del ARN del virus del mosaico del tabaco es más intensa cuando se trata su ARN aislado que cuando se trata el virus completo, al contrario de lo que ocurre con la frecuencia de mutación.

Cerdá Olmedo et al. (1968) encontraron que la mayor parte de las mutaciones causadas al cromosoma de Escherichia coli por la nitrosoguanidina estaban acumuladas en la región de replicación. En cambio la metilación del ADN es más probable que se distribuya por todo el cromosoma, puesto que se encuentran derivados metilados de todas las bases menos de la timina (Singer, 1968; Craddock, 1969; Lawley y Thatcher, 1970). Además

(Dugle, 1973) hay una correlación entre el número de incisiones y la metilación del ADN por nitrosoguanidina (del número de incisiones se deduce que tienen que estar distribuidas por todo el cromosoma). Al mismo tiempo Kimball y Setlow (1974) han demostrado en Haemophilus influenzae la necesidad de un período de replicación para que las mutaciones aparezcan, después del tratamiento con nitroguanidina. Si el ADN se extraía inmediatamente después del tratamiento y con él se intentaban transformar células de otra estirpe no se obtenían mutantes.

Koshinuma et al. (1970) probaron en Escherichia coli hasta 20 derivados de la nitrosoguanidina. Los diez que poseían un grupo nitroso mostraban actividad mutagénica, pero los otros diez, que no lo poseían, no dieron frecuencia de mutantes apreciable. Cuando en vez del grupo metilo había una cadena alquílica, la mutagenicidad se notaba menos, particularmente a partir de cinco carbonos. Otras investigaciones de derivados de la nitrosoguanidina fueron las de Schwaier (1965) y Gichner y Vele-mínský (1967). De todos los derivados, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (abreviada aquí nitrosoguanidina) mostró la mayor mutagenicidad.

Se conocen sin embargo otros compuestos relacionados que son tan mutagénicos o más que la nitrosoguanidina, como la N-metil-N'-nitroso-urea, "nitrosometano"

y el nitrosocarbaril (Kimball y Setlow, 1974).

TIPOS DE MUTACIONES CAUSADAS POR LA NITROSOGUANIDINA

Las mutaciones producidas por la nitrosoguanidina son casi siempre reversibles por el mismo agente y también por otros mutágenos que causan principalmente cambios de una base por otra (Eisenstark et al., 1965). La propia nitrosoguanidina actúa principalmente causando cambios de base (Eisenstark et al., 1965; Whitfield et al., 1966), normalmente transiciones y transversiones. Se ha encontrado muy raramente algún cambio de fase (Oeschger y Hartman, 1970; Riddle y Roth, 1970). Recientemente, Isono y Yourno (1974) han aplicado la capacidad de revertir mutaciones por ICR-191, y en un caso que se aplicó el análisis detallado se vió que la nitrosoguanidina inducía la pérdida de un par GC.

De los anteriores estudios se deduce que la nitrosoguanidina no parece inducir deleciones ya que si así fuera no se podrían revertir las mutaciones inducidas.

ESPECIFICIDAD DE LOS MUTAGENOS

Hay un grupo importante de mutágenos que causan mutaciones sólo en los genes que se están replicando en presencia de la droga. Entre ellos están el 5-bromouracilo

y la 2-aminopurina, que actúan principalmente incorporándose en el ADN en vez de las bases correspondientes. Estos mutágenos alteran la estructura química conduciendo a errores, bien por sí mismos o porque aparean equivocadamente con otra base. Las situaciones extremas de pH pueden dar lugar a mutaciones análogas al ionizar las bases y alteran su capacidad de formación de puentes de hidrógeno durante la replicación.

Ryan y Cetrullo (1963) demostraron que la 2-aminopurina induce errores en los genes en replicación de cultivos sincronizados de Escherichia coli. Estos mutágenos tienen el defecto de ser generalmente poco efectivos, por lo que no son apropiados para identificar genéticamente los genes que se replican.

Hay otro tipo de mutágenos que actúan alterando directamente la estructura del ADN, independientemente de que haya replicación o no. A este segundo grupo pertenecen el ácido nitroso, la hidroxilamina, los agentes alquilantes (sulfonato etilmetílico, dimetílico), la luz ultravioleta y las radiaciones ionizantes.

La nitrosoguanidina podría incluirse aquí, a priori, por su acción metilante. Sin embargo su acción mutagénica

es más afín a la de los mutágenos del grupo anterior, ya que causa mutaciones preferentemente en las regiones en replicación y, como veremos más adelante, errores de copia, y no alterando directamente el ADN.

COMUTACION CON NITROSO Guanidina

CAPITULO 2

COMUTACION CON NITROSOGUANIDINA

2.1 Supervivencia de E. coli SE1 después del tratamiento con nitrosoguanidina.

La supervivencia de E. coli SE1 en diferentes soluciones tampón de nitrosoguanidina tiene un máximo a pH 5 y disminuye a medida que el pH aumenta según se deduce de la Tabla 2.1. A pH = 6 y hasta pH = 7.5 la letalidad va aumentando pero aún queda viva una fracción bastante alta del cultivo original.

La máxima estabilidad de la nitrosoguanidina en presencia de células es a pH = 5, Como se ve, pues, la letalidad se correlaciona con la inestabilidad de la nitrosoguanidina. A medida que aumenta el pH (5.0 a 7.5) la descomposición de nitrosoguanidina en diazometano aumenta, y a la vez la letalidad y la mutagénesis de las células es mayor (Tabla 2.1). Está en discusión si los efectos letales y mutagénicos de la nitrosoguanidina son debidos a la descomposición en diazometano (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968).

2.2 Cinética de la expresión de mutaciones Azi^r inducidas por nitrosoguanidina.

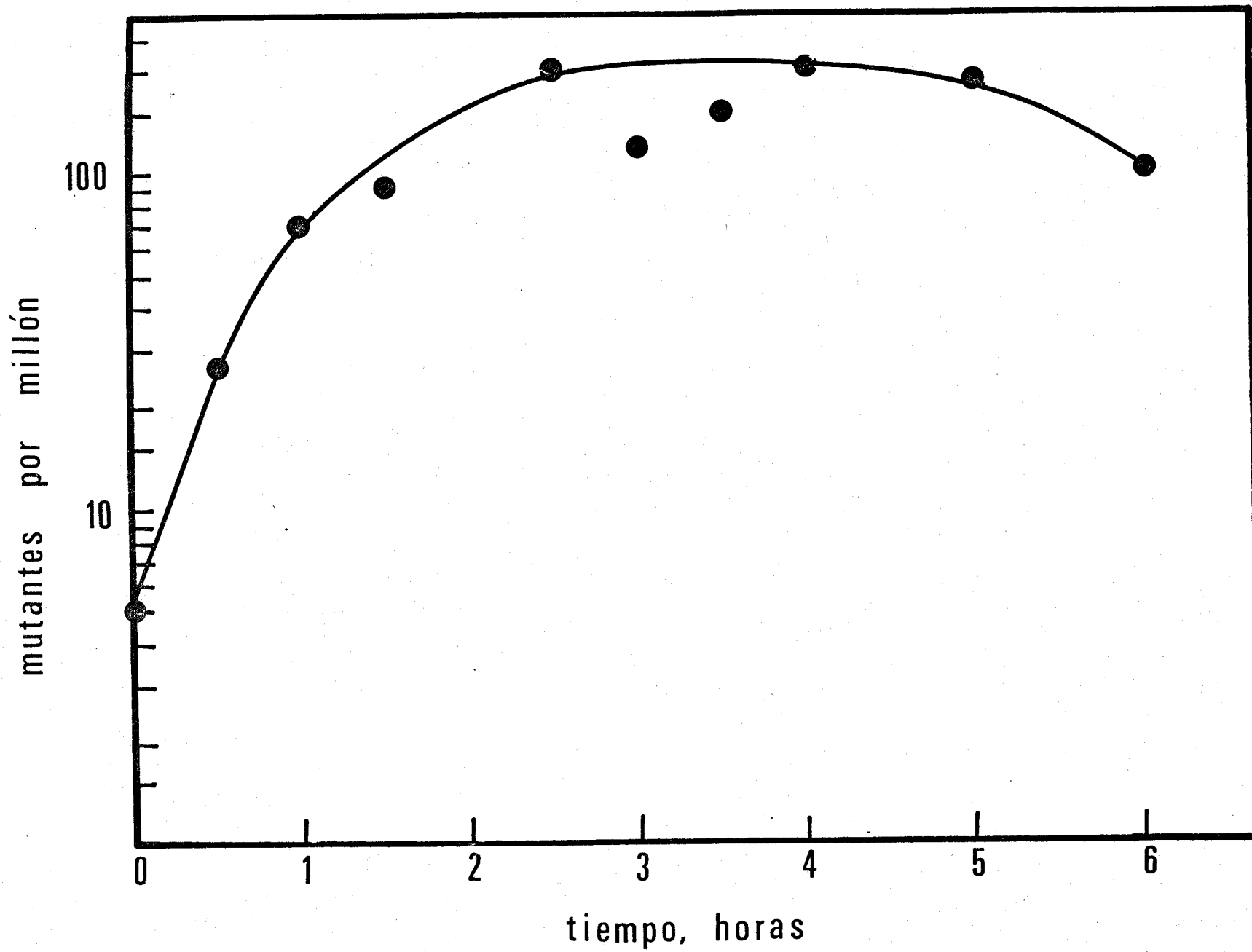
La aparición de mutantes resistentes a azida de sodio ha sido estudiada en función del tiempo transcurrido desde el tratamiento con nitrosoguanidina. En la Figura 2.1 se observan muy pocas mutaciones inmediatamente después del tratamiento (5 mutantes por millón) en comparación con los 200 mutantes por millón obtenidos a las 3 horas de crecimiento.

Todos los recrecimientos después de mutagénesis con nitrosoguanidina fueron hechos en caldo nutritivo en el cual una generación de E. coli SE1 tarda aproximadamente 20 minutos.

La densidad óptica de los primeros momentos no se corresponde con el conteo vivo por haber una parte de las células muertas en el tratamiento con nitrosoguanidina. Para este tratamiento se empleó tampón tris-maleato de pH = 5.5 por lo cual la letalidad no es demasiado grande en este experimento.

Por otra parte los individuos que han resultado mutantes para resistencia a una droga suelen ser menos aptos en ausencia de la droga que los no mutantes. Cuando los ponemos a vivir en caldo nutritivo de Luria después de la mutagénesis van siendo seleccionados en contra y puede disminuir su proporción.

FIGURA 2.1. Cinética de aparición de mutantes resistentes a la azida de sodio en la estirpe SE1 tras el tratamiento con nitrosoguanidina y durante incubación en caldo nutritivo por el tiempo expresado en abscisas.



La expresión de la mutación y la selección contra los mutantes son efectos contradictorios; el primero es más importante inmediatamente después del tratamiento y el segundo, a largo plazo.

El hecho de que se encuentran más mutantes desde las 2 horas 30 minutos hasta las 5 horas después del tratamiento se debe a que hay un cierto período entre los daños que causamos al ADN y la formación de estructuras mutantes adecuadas como enzimas, ribosomas, membranas, pared celular, etc. Además, E. coli, en las condiciones de cultivo que empleamos, tiene normalmente de 2 a 4 cromosomas iguales por bacteria en cuyo caso, aunque causemos daños a uno de ellos los demás seguirán proporcionando copias correctas de la enzima que afecta el gen y por lo tanto la mutación puede no ser observable fenotípicamente hasta que dicha bacteria se divida en 2 ó 4 células hijas. También la fase de "lag" o recuperación de las células después del tratamiento influye en el período de división y por lo tanto en la expresión fenotípica de la mutación afectada.

La Figura 2.1 nos indica que el tiempo óptimo de recrecimiento después de mutagénesis con nitrosoguanidina para obtener un máximo de mutaciones resistentes a la azida es de tres horas.

2.3 Distribución de requerimientos auxotróficos entre las colonias azi.

Se estudió si las colonias resistentes a azida presentaban diferentes requerimientos auxotróficos (Figura 2-2); resultaron muchas más colonias que requieren leucina (leu) o incapaces de fermentar arabinosa (ara), genes próximos al responsable de la resistencia a la azida (azi), que los que requieren histidina (his), fenilalanina (phe) o isoleucina y valina (ily), genes marcadores alejados de (azi). El experimento fue repetido a diferentes valores de pH, desde 5.0, hasta 7.5 (Tabla 2.1 y Figura 2.3).

La exagerada frecuencia de mutaciones en genes cercanos a azi no es una propiedad de estos mismos genes, ya que si la población no es seleccionada para resistencia a la azida, sino que se siembra en agar nutritivo, se encuentra una distribución completamente diferente de mutaciones auxotróficas. En este caso la mayor proporción de las mutaciones leu y ara en comparación con las mutaciones his desaparece por completo.

La adición de 100 µg/ml de nitrosoguanidina a un cultivo causa un cese abrupto y completo de la síntesis de ADN (Guerola et al., 1971). El movimiento de replicación está en casi todas las células

FIGURA 2.2. Mapa de *E. coli* K-12 (Taylor, 1972) que muestra la disposición de los marcadores usados en estos estudios. Las flechas indican el origen y direcciones de replicación (Masters y Broda, 1971; Bird et al., 1972). Los símbolos, ser, thr, leu, his, phe, ilv, indican posiciones de mutantes que requieren serina, treonina, leucina, histidina, fenilalanina e isoleucina + valina respectivamente; azi significa resistencia a 250 $\mu\text{g/ml}$ de azida de sodio; ara indica incapacidad de utilizar L(+) arabinosa como fuente de carbono. Los números entre paréntesis indican posiciones del mapa en minutos. El mapa tiene en total 90 minutos.

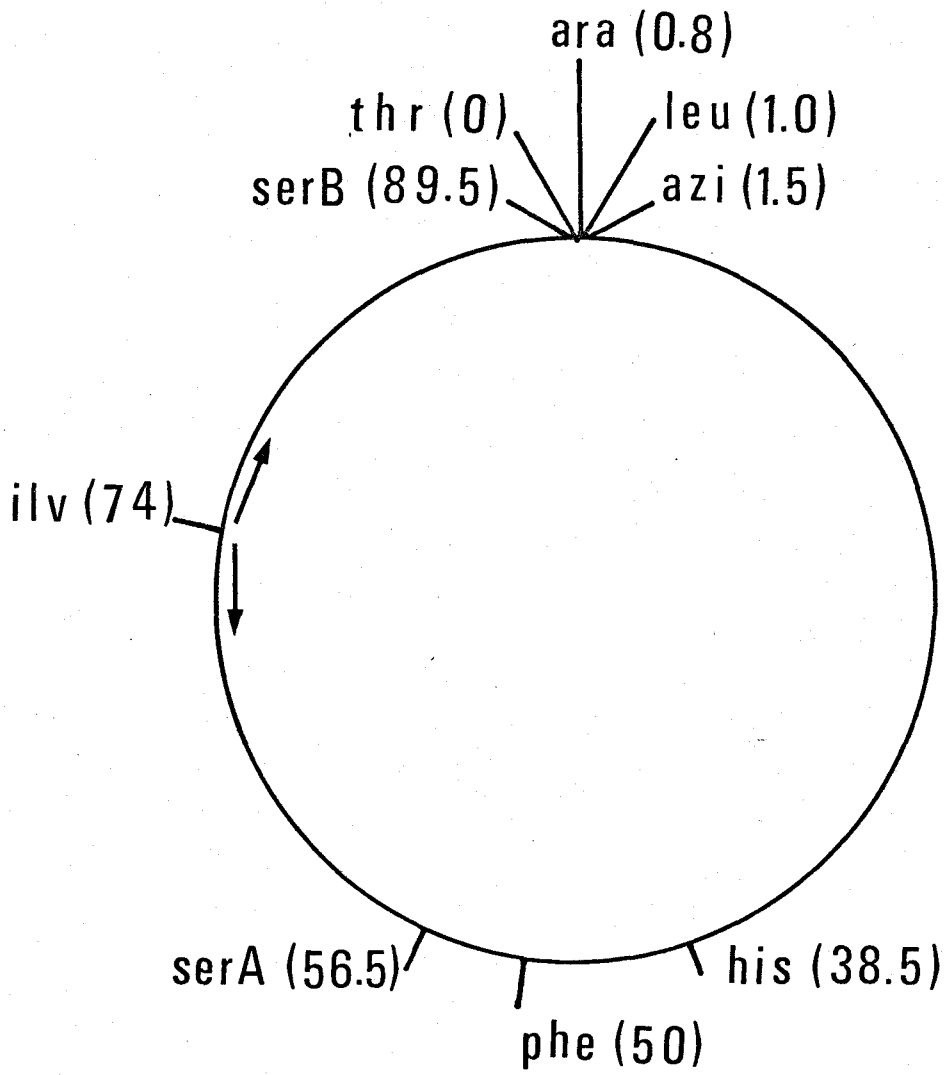
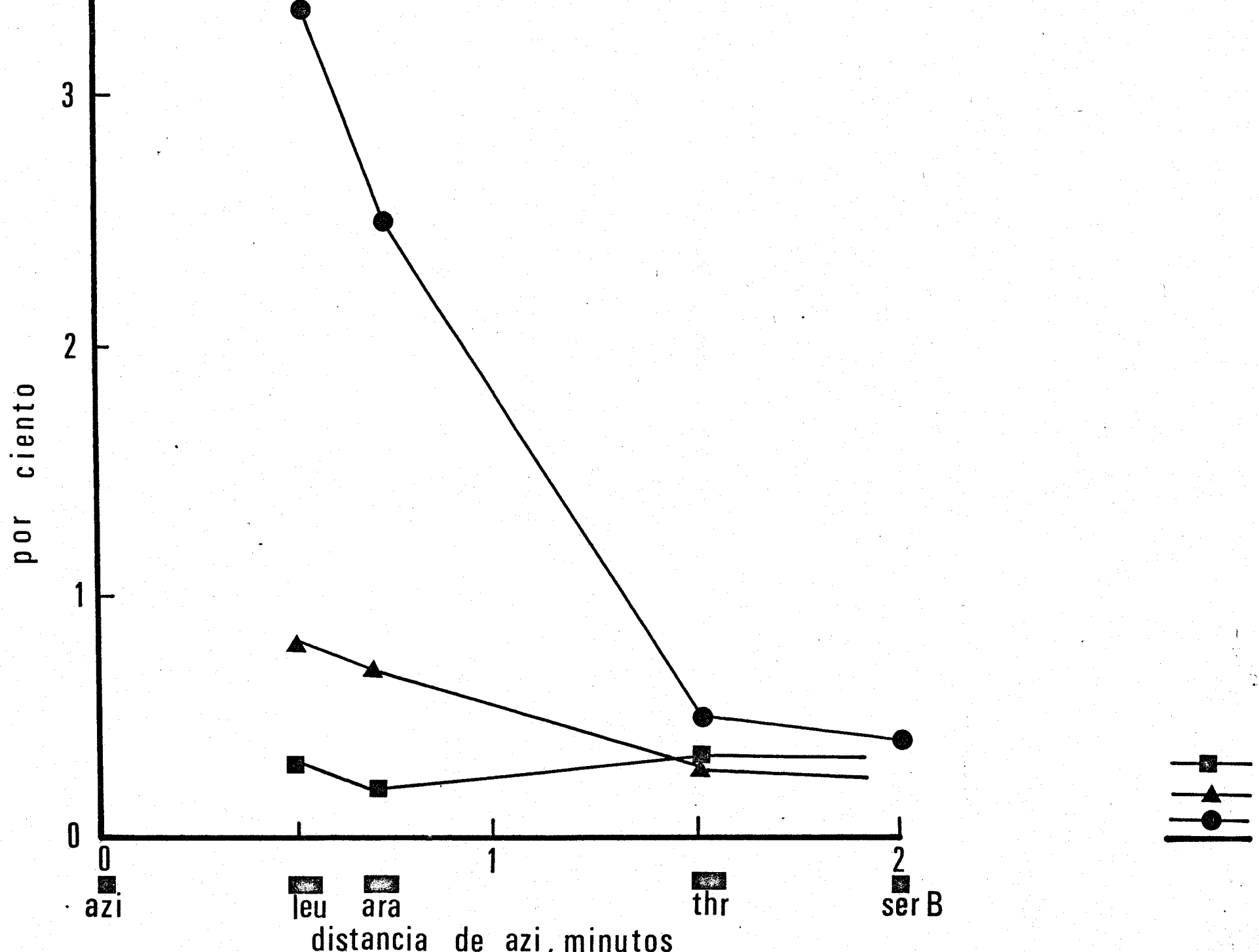


FIGURA 2.3. Relación entre la frecuencia de mutaciones y la distancia entre azi y los genes asociados con estas mutaciones. Las líneas gruesas bajo el eje de abcisas indican la longitud aproximada de los genes. Todos estos experimentos con nitrosoguanidina se hicieron en Tris-maleato a pH 7.5. El cultivo estaba creciendo exponencialmente en medio mínimo con glucosa antes de la mutagénesis. ● Las colonias probadas para requerimientos auxotróficos se seleccionaron previamente por su resistencia a 250 µg/ml de azida sódica. ▲ Un cultivo privado de aminoácidos durante 90 minutos antes de la mutagénesis; colonias seleccionadas previamente para resistencia a azida de sodio. ■ Cultivo creciendo exponencialmente antes de mutagénesis en el cual las colonias probadas para requerimientos auxotróficos no fueron seleccionados previamente.



completamente parado durante los 30 minutos que dura la mutagénesis. Además el tratamiento tiene lugar en tampón como precaución adicional para detener la replicación y reducir al mínimo la letalidad.

Resulta pues que la nitrosoguanidina tiene tendencia a producir mutaciones estrechamente ligadas.

2.4 Mutagénesis en una población con la replicación detenida a término.

La presencia de segundas mutaciones es indeseable en algunos casos. Una posibilidad de evitarlo sería quitar todos los puntos de replicación y entonces se obtendrían posiblemente mutaciones esparcidas al azar sobre todo el cromosoma. Para estudiar esta posibilidad se privó a un cultivo de todos los aminoácidos requeridos por el mismo, pero no de timina, uracilo o glucosa, durante 90 minutos antes de la mutagénesis; de esta forma se espera que los ciclos de replicación habrán sido completados y que no reiniciarán nuevos ciclos (Cerdá-Olmedo, Hanawalt, y Guerola, 1968; Maaløe y Hanawalt, 1961). Bajo estas condiciones la frecuencia de mutaciones es mucho más baja, pero las mutaciones estrechamente ligadas son aún abundantes (Tabla 2.1, línea 6, y Figura 2-3). Esto indica que una fracción detectable de las regiones replicativas aún quedan cerca de azi, quizá debido a que se pararon en esta zona antes de completar el ciclo o porque lo

reiniciaron; se ha estimado (Guerola et al., 1971) que la fracción de los puntos de replicación detenidos en la región de azi es el 6% de los presentes, durante crecimiento exponencial.

El hecho de que algunos cromosomas no completan el ciclo durante la carencia de aminoácidos ha sido sugerido por otros estudios en Bacillus subtilis (Copeland, 1969).

2.5 Reciprocidad de la comutación.

Hemos demostrado que una gran parte de los mutantes azi obtenidos con nitrosoguanidina contienen además mutaciones en genes vecinos, como leu y ara. Si consideramos el efecto de la nitrosoguanidina sobre dos genes próximos A y B, esperaremos que la nitrosoguanidina, además de producir mutantes en A y en B, produzca mutantes dobles AB con mucha mayor frecuencia que la esperada por azar. Parece lógico que si al seleccionar mutantes A se encuentran muchos que llevan mutaciones en B, recíprocamente, al seleccionar mutantes B se encuentran muchos que llevan también mutaciones en A.

Para comprobar experimentalmente esta reciprocidad se obtuvieron primeramente mutantes leu y ara (genes que están muy cerca en el cromosoma de E. coli

TABLA 2.1. Distribución de requerimientos auxotróficos entre las colonias mutantes resistentes a la azida de sodio en SE1, después del tratamiento con nitrosoguanidina. El experimento fue repetido a diferentes valores de pH, desde 5.0 hasta 7.5

<u>Cultivo tratado</u>	<u>pH durante tratamiento</u>	<u>Fracción superviviente</u>	<u>Resistentes a azida (por millón)</u>	<u>Mutaciones "auxotróficas"</u>			
				<u>Colonias probadas Tipo</u>	<u>Número</u>	<u>"Auxotróficas" Total</u>	<u>%</u>
Exponencial	5.0	1.0	70	<u>azi</u>	696	100	14.4
"	5.5	0.95	20	<u>azi</u>	1212	64	5.3
"	"	0.38		<u>azi</u>	1032	86	8.3
"	6.0	0.28	190	<u>azi</u>	1450	162	11.2
"	7.5	0.12	330	<u>azi</u>	790	119	15.1
Carencia de aminoácidos	"	0.26	77	<u>azi</u>	2550	107	4.2
Exponencial	"	0.05		no seleccionadas	1814	109	6.0

Requerimientos y distancia genética de azi

<u>leu(0.5)</u>	<u>ara(0.7)</u>	<u>thr(1.5)</u>	<u>ser(2.0)</u>	<u>ilv(27.5)</u>	<u>his(37.5)</u>	<u>phe(41.5)</u>	<u>otros</u>
20	15	5	8		4		48
27		6			2		29
12	24	1		2	0	1	46
23	15	8			4		112
26	20	4	3		1		65
20	17	8		1	5		56
4	3	6		2	6		88

y por tanto dentro de la distancia de comutación) tratando el tipo silvestre B/5 con nitrosoguanidina y seleccionando con penicilina. SE35 requiere leucina y se escogió entre otros nueve mutantes leu por tener una frecuencia de reversión muy alta y colonias suficientemente homogéneas. Utiliza normalmente la arabinosa. SE40, derivado de B/5 del mismo modo, es incapaz de vivir en arabinosa como única fuente de carbono. No requiere leucina.

El SE40 (Ara^-) se trató con nitrosoguanidina y las colonias que crecieron en medio mínimo con arabinosa en vez de glucosa (revertientes Ara^+) se transplantaron mediante palillos estériles a medio sólido con glucosa y leucina y a otro con arabinosa e histidina. Las colonias que crecieron en el primero pero no en el segundo son Leu^- , y se considera que han sufrido mutación en alguno de los genes leu. Las que crecen en el segundo pero no en el primero son His^- y se considera que han sufrido mutación en alguno de los genes his. Los resultados aparecen en la Tabla 2.2

El SE35 (Leu^-) se trató con nitrosoguanidina y se sembró en medio mínimo sin leucina. Las colonias resultantes (revertientes (Leu^+)) se trasplantaron a un medio sólido conteniendo glucosa y a otro conteniendo arabinosa e histidina. Las colonias que crecían en el segundo pero no en el primero son His^-

y las que crecían en el primero pero no en el segundo son Ara⁻. Los resultados aparecen en la Tabla 2.2

Un 3.3% de los mutantes Leu⁺ eran también Ara⁻ y un 2.2% de los mutantes Ara⁺ eran también Leu⁻, lo cual permite afirmar la reciprocidad de la comutación entre los genes cercanos ara y leu.

Tabla 2.2. Reciprocidad de la comutación. SE40 (Ara⁻) fue tratado con nitrosoguanidina y las colonias revertientes Ara⁺, trasplantadas a medio mínimo sin leucina y sin histidina, para comprobar frecuencia de dobles mutaciones. SE35 fue tratado del mismo modo con nitrosoguanidina y las colonias Leu⁺ resultantes comprobadas en placas con arabinosa sólo. como fuente de carbono, y para requerimientos de histidina.

<u>N°de Exp.</u>	<u>Cel. trat. por ml.</u>	<u>Cel. después tratamiento</u>	<u>Mutantes por millón</u>	<u>Col. trasp.</u>	<u>Leu⁺</u>	<u>His</u>
SE40 (Ara ⁻)						
B ₆₃	3.7x10 ⁸	2.55x10 ⁷	10	180	10	0
B ₆₄	3.4x10 ⁹	2.75x10 ⁸	2.6	<u>900</u>	<u>13</u>	<u>1</u>
TOTAL				1,080	23	1
SE35 (Leu ⁻)						
B ₅₀	9.1x10 ⁸	8.5x10 ⁶	15.6	91	<u>Ara⁺</u> 5	0
B ₆₅	1.41x10 ⁸	5.0x10 ⁶	16.2	<u>500</u>	<u>15</u>	<u>1</u>
TOTAL				591	20	1

ALEATORIEDAD DE LAS MUTACIONES INDUCIDAS
CON LUZ ULTRAVIOLETA

CAPÍTULO 3

ALEATORIEDAD DE LAS MUTACIONES INDUCIDAS CON LUZ ULTRAVIOLETA

3.1 Supervivencia de E. coli SE1 y SE35 al trata- miento con luz ultravioleta.

Las bacterias de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (densidad óptica entre 0.3 y 0.5) fueron centrifugadas y lavadas dos veces para evitar que los componentes del medio sufrieran descomposición por la luz ultravioleta y pudieran interferir posteriormente con la mutagénesis. Inmediatamente después de lavadas, se resuspendieron en tampón tris-sales y se llevaron bajo la lámpara germicida para el tratamiento.

La Figura 3-1 presenta la fracción superviviente de un cultivo SE1 tras distintos períodos de exposición a la luz ultravioleta. SE1 presenta una resistencia comparativamente alta pero menor que la de E. coli B/r. La forma de la curva con un período inicial de escasa letalidad, suele ser atribuida a la existencia de más de un cromosoma por célula y a la acción de un sistema enzimático eficaz de reparación.

La figura 3-2 indica la supervivencia de un cultivo SE35 y la frecuencia de mutaciones Leu⁺ en función de la dosis del tratamiento.

FIGURA 3.1. Efecto letal de la luz ultravioleta sobre la estirpe E. coli SE1, tras distintos períodos de exposición. La gráfica muestra la fracción superviviente a cada dosis.

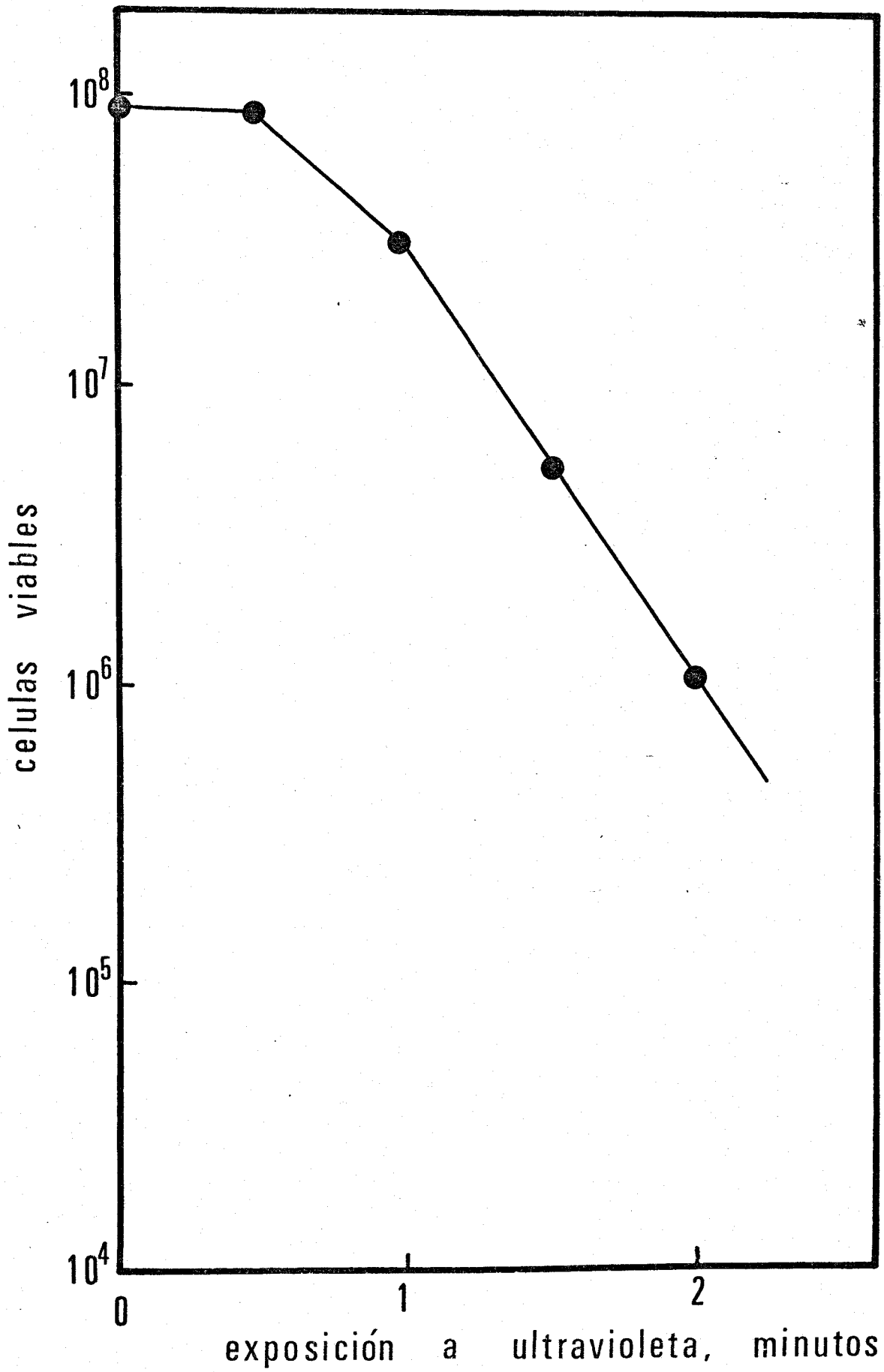
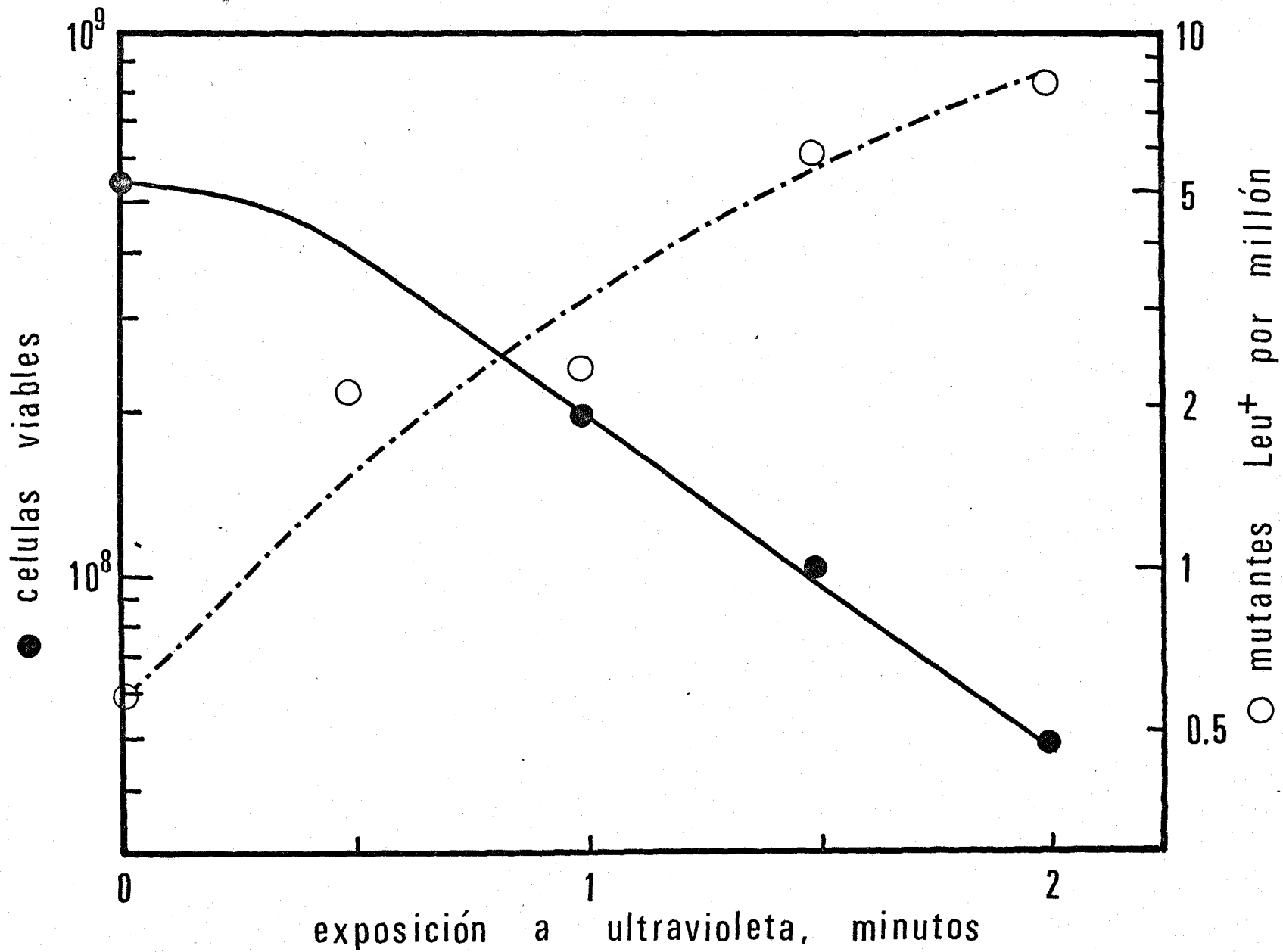


FIGURA 3.2 ● Supervivencia de E. coli SE35 al tratamiento con luz ultravioleta tras diferentes tiempos de exposición. ○ Frecuencia de mutantes Leu^+ por millón de supervivientes, correspondientes a los mismos tiempos de tratamiento.



SE35 mostró en general una supervivencia muy alta, sobre todo cuando se compara con otras estirpes de E. coli. A 30 y a 60 segundos la letalidad es casi nula a pesar de que las mutaciones alcanzan un nivel ya considerable. A los 2 minutos la supervivencia aún se mantiene al nivel elevado del 10%. Haynes (1970), al indicar la enorme resistencia de B/r al tratamiento con luz ultravioleta, la atribuyó a una gran capacidad de reparación.

3.2 Cinética de la expresión de mutaciones Azi^r en SE1 y Leu⁺ en SE35.

Para poder aislar mutantes Azi^r de SE1 y comprobar posteriormente si además contienen otra mutación en genes próximos, debemos determinar primeramente las condiciones óptimas para la expresión y detección de dicha mutación. Para ello las células tratadas con luz ultravioleta se cultivan en medio nutritivo diluyendo cuando la concentración de células, estimada por su densidad óptica, se hace muy alta (más de 10^9 células por ml.) para mantenerlo en crecimiento. Se toman muestras y se determina viabilidad total y proporción de células que resisten 250 $\mu\text{g/ml}$ de azida de sodio en agar nutritivo.

Antes del tratamiento las células resistentes son menos de 0.1 por millón; inmediatamente después del tratamiento se encuentran aproximadamente 5 por millón y la pro-

porción crece con el tiempo de incubación hasta alcanzar un amplio máximo hacia 3 horas de incubación con unas 50 células resistentes por millón (figura 3-3). El período de cultivo posterior al tratamiento permite la expresión de la mutación, es decir, la síntesis de estructuras celulares copiadas de los nuevos genes mutados y por tanto resistentes a la droga. Además es necesaria la segregación de los cromosomas que hay en cada núcleo puesto que sólo uno es posible que haya mutado en las células mutantes. Si el período de cultivo se prolonga se observa un decrecimiento, debido, probablemente, a inferioridad competitiva de los mutantes resistentes a la azida frente a las células normales en ausencia del inhibidor. Como conclusión práctica adoptamos tres horas como período de cultivo óptimo para expresar mutaciones de resistencia a la azide inducidas por la luz ultravioleta.

Los mutantes Leu^+ que provienen de SE35 aparecen con una frecuencia ya apreciable incluso tras dosis pequeñas de luz ultravioleta. Sin embargo hay bastante variabilidad en las frecuencias de mutantes de un experimento a otro debido principalmente a variaciones en el estado fisiológico de las células (no todas están creciendo exponencialmente) y en el número de células empleado durante el tratamiento y en las siembras. Este efecto es conocido de antiguo y se considera debido a que las células muertas

liberan leucina y facilitan el crecimiento de unos pocos mutantes Leu⁺.

Las reversiones Leu⁺ no requieren cultivo en medio nutritivo entre el tratamiento y la detección de los mutantes porque en el caso que hubiera dos cromosomas por célula en el momento de la mutagénesis, sería suficiente que uno de ellos resultara afectado y capaz por tanto de fabricar leucina para que la célula pudiera vivir en medio mínimo sin leucina y formar una colonia normal.

3-3. Aleatoriedad de las mutaciones inducidas por luz ultravioleta.

Después del tratamiento con luz ultravioleta (90 segundos) y recrecimiento en caldo nutritivo durante 3 horas, las células de SE1 se siembran en agar nutritivo al que se ha adicionado 250 µg/ml de azida de sodio. Las colonias resultantes (presuntos mutantes en el gen azi) se trasplantan a distintos medios para detectar mutaciones en otros genes, en particular auxótrofos en total, auxótrofos para la leucina (genes próximos a azi) y auxótrofos para histidina (genes lejanos a azi).

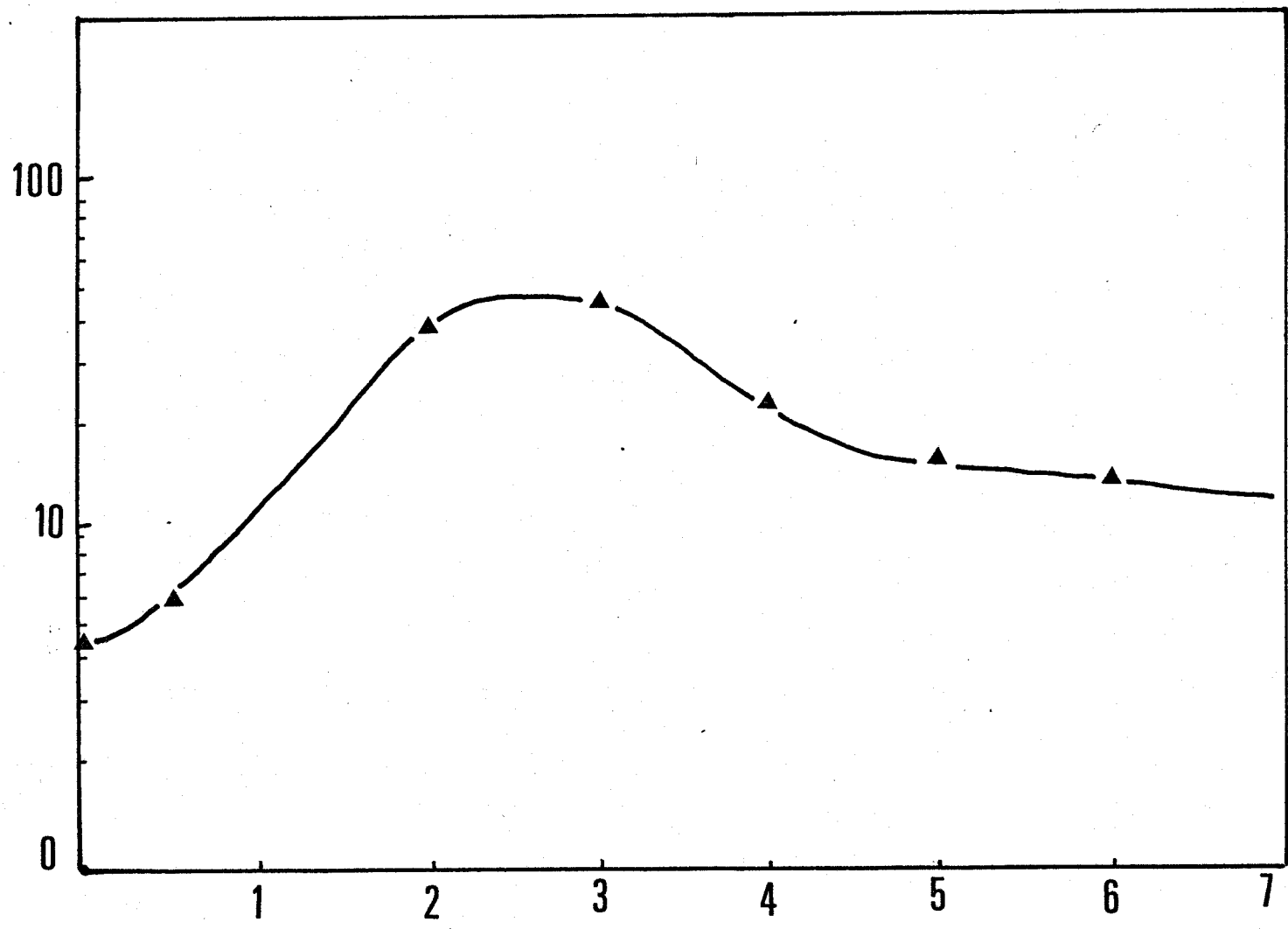
Los resultados de los experimentos realizados están en la Tabla 3-1. En ella se indican en particular la fracción superviviente al tratamiento, la proporción de mutantes resistentes a la azida a las tres horas de recrecimiento y los mutantes auxotróficos encontrados entre colonias que eran resistentes a azida.

Los resultados similares con nitrosoguanidina dan una proporción muy alta de auxótrofos para la leucina (casi la mitad de los auxótrofos en total) y mucho menor para histidina. Es decir, la ocurrencia de una mutación en azi va acompañada de una frecuencia muy alta de mutaciones en los genes vecinos leu pero no en los lejanos his.

Si exceptuamos el 1° de los experimentos de la Tabla 3-1 todos los demás no muestran una proporción elevada de mutantes Leu. Sin embargo la baja proporción de células supervivientes y por tanto los pocos mutantes al empezar el recrecimiento hacen que haya pocas mutaciones independientes de resistencia a la azida. Esto significa que en el experimento N° 1, una célula con mutación Azi^r que además contenía otra mutación Leu⁻ pudo dividirse muchas veces; el resultado final carece de significación estadística (efecto del "fundador" o del "cuello de botella"). Aún sumando en la tabla 3-1 los datos del experimento 1, los mutantes Leu⁻ hallados entre las colonias Azi^r serían menos de 1 por mil o sea muy lejos del 3,3 por cien que se encuentra cuando se mutageniza con nitrosoguanidina. Por tanto la luz ultravioleta no presenta un efecto de comutación comparable al de la nitrosoguanidina.

Para corroborar por otro sistema completamente diferente si hay comutación tras el tratamiento con luz ultravioleta, las colonias Leu⁺ resultantes después del tratamiento de la estirpe SE35 se trasplantaron mediante palillos estériles a

FIGURA 3.3 Cinética de aparición de mutantes resistentes a la azida de sodio en la estirpe SE1 tras irradiación con luz ultravioleta de 260 Å e incubación posterior en caldo nutritivo por el tiempo expresado en abscisas.



agar mínimo con histidina y con arabinosa en vez de glucosa. De este modo las colonias que crecían en la primera caja pero no en la segunda se consideraban Ara⁻ y las que crecían en la segunda caja sin hacerlo en la primera eran His⁻. Se probaron en total 1,750 colonias Leu⁺ de las cuales 4 eran Ara⁻ o sea sólo el 0,22%, cifra muy pequeña si se compara con la de las colonias Ara⁻ resultantes de la comutación con nitrosoguanidina, que es 3,3%, o sea diez veces mayor. La frecuencia de mutación para his dentro de las mismas colonias fué aún menor (= 0,05%).

De la tabla 3-2 se deduce, pues, que la luz ultravioleta no tiene la misma preferencia que la nitrosoguanidina para producir mutaciones estrechamente ligadas en una zona muy pequeña del cromosoma. También indica que si obtenemos un mutante Leu⁺ con nitrosoguanidina la probabilidad de que resulte ser también mutante deficiente en el gen ara es del 3,3%, mientras que si dicho mutante se obtiene con luz ultravioleta la probabilidad de que haya resultado mutante también en ara es sólo del 2,2 por mil.

TABLA 3-1. Distribución de las mutaciones inducidas con luz ultravioleta, SE1. Los mutantes resistentes a la azida, ensayados a las tres horas del tratamiento, son probados en diversos medios para detectar auxótrofos en general y auxótrofos para la leucina y la histidina.

Experimento	Células tratadas	Fracción superviviente	Mutantes <u>azi</u> por 10 ⁶	Colonias <u>azi</u> probadas	Auxótrofos		
					Totales	<u>leu</u>	<u>his</u>
1	9'5 x10 ⁸	0'051	10	1283	33	7	1
2	9'05 x10 ⁸	0'082	13	1314	27	1	1
3	1'2 x10 ⁹	0'098	12	1423	27	0	0
4	2'4 x10 ⁹	0'042	23	180	24	0	0
5	9'0 x10 ⁸	0'189	12	500	23	0	0
6	4'4 x10 ⁸	0'125	11	500	1	0	0
7*	8'3 x10 ⁸	0'028	7	1200	26	0	0
8	8'6 x10 ⁹	0'006	8	700	25	0	0
9	3.9 x10 ⁸	0'282	5	1100	5	0	0

* Mutantes azi seleccionados con 125 µg /ml de azida de sodio.

TABLA 3-2. Distribución de las mutaciones inducidas con luz ultravioleta en SE35.

Experimento	Células tratadas	Fracción superviviente	Mutantes leu ⁺ por 10 ⁶	Colonias leu ⁺ probadas	Auxótrofos	
					Totales	ara ⁻ his ⁻
1	7,0x10 ⁷	0.94	2,2	150	1	-
2	1,2x10 ⁹	0.51	0,3	350	1	-
3	2,0x10 ⁸	0.65	1,9	500	1	1
4	<1,8x10 ⁸	0.17	8,4	200	0	0
5	5,5x10 ⁷	0.14	6	300	2	0
6	1,01x10 ⁹	0.16	0,3	120	0	0
7	1,58x10 ⁹	0.12	0,4	130	0	0
TOTAL				1750	5	1
‡					0,22	0,05

ALEATORIEDAD DE LAS MUTACIONES PRODUCIDAS
CON SULFONATO ETILMETILICO

CAPITULO 4

ALEATORIEDAD DE LAS MUTACIONES PRODUCIDAS CON SULFONATO ETILMETILICO

4.1 Supervivencia de SE1 y SE35 al tratamiento con sulfonato etilmetílico.

El sulfonato etilmetílico es uno de los agentes mutagénicos más empleados corrientemente. Parece ser que su acción más importante sobre el ADN es la metilación o alquilación de sus bases. Decidimos probar, pues, si se obtenía con él el mismo efecto de comutación que con la nitroso-guanidina.

La Figura 4.1 nos da la fracción de células SE1 supervivientes tras distintos tiempos de exposición al sulfonato etilmetílico, variando además la concentración (0,1M y 0,3M). La letalidad es siempre muy rápida. Adopto una exposición de 10 minutos a la concentración 0,1M para futuros experimentos, ya que la detección de mutantes exige que una gran parte de la población sobreviva y porque la concentración 0,3M está en el límite de la solubilidad siendo causa considerable de error en los experimentos.

FIGURA 4.1 Efecto letal del sulfonato etilmetílico sobre células de E. coli SE1. ● Fracción de células supervivientes tras diferentes tiempos de exposición a concentración 0.1M de sulfonato etilmetílico. ▲ Fracción de células supervivientes a una concentración 0.3M.

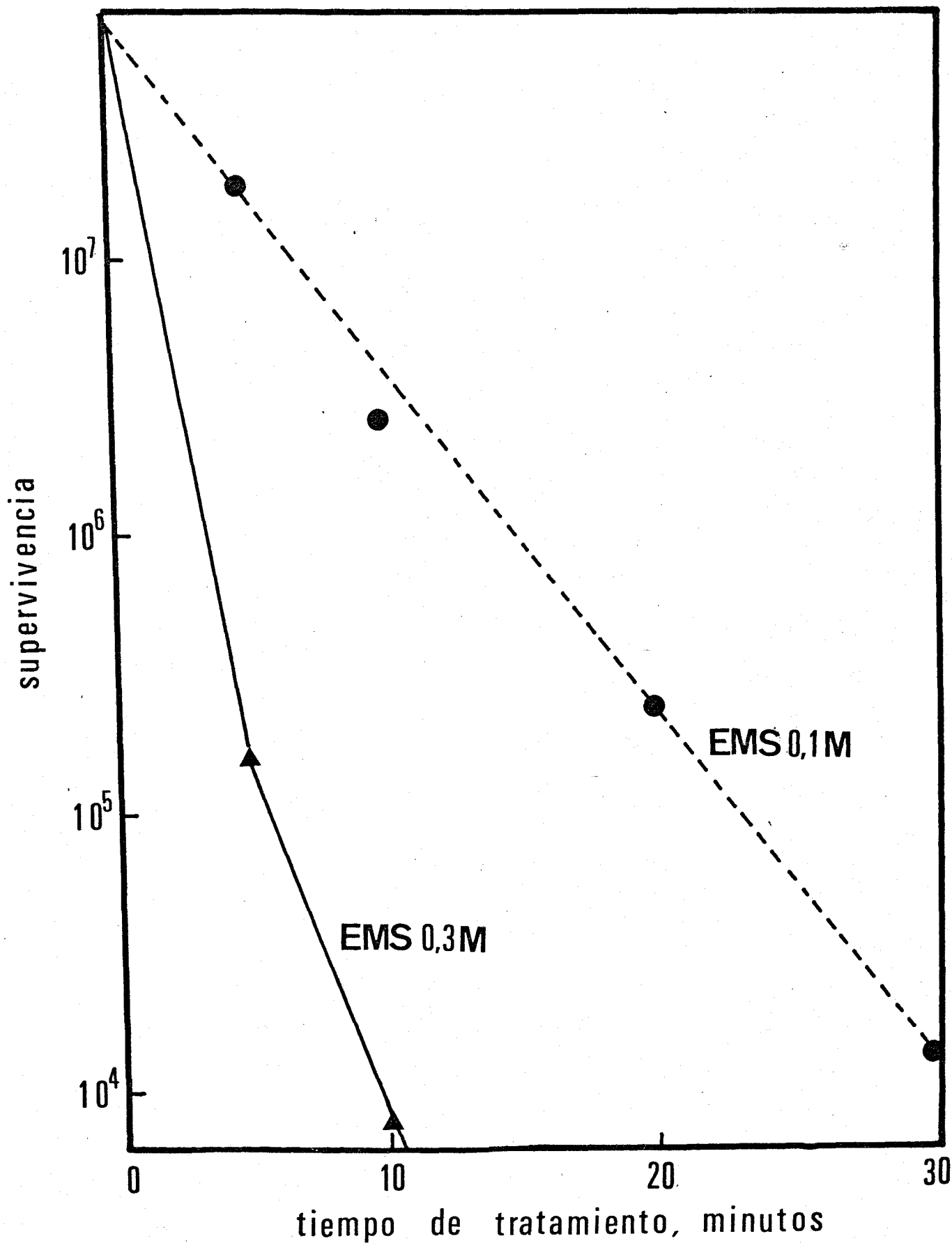
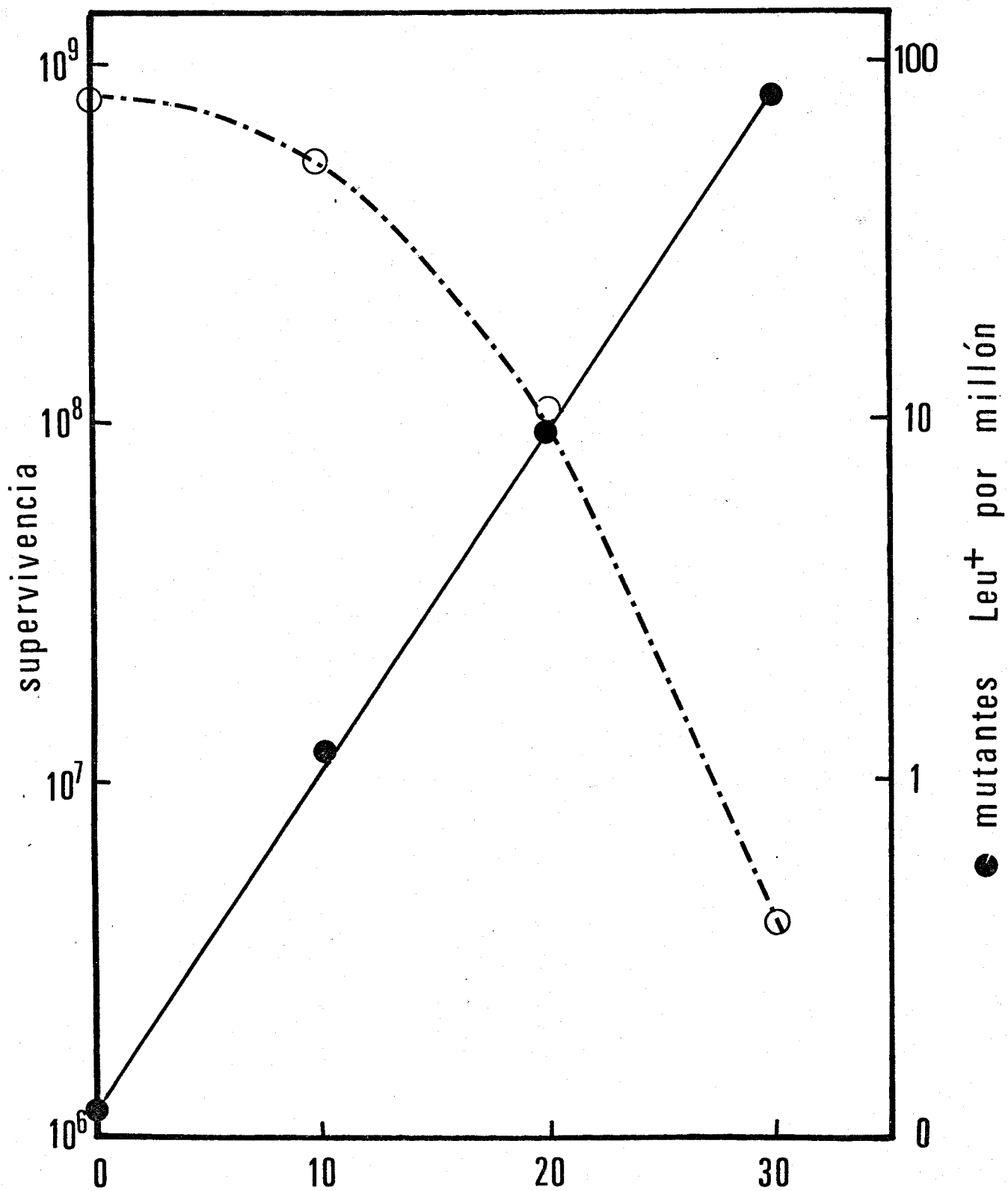


FIGURA 4.2 ○ Supervivencia de E. coli SE35 al tratamiento con sulfonato etilmetílico 0.1M.

● Frecuencia de mutantes Leu^+ por millón aparecidos tras diferentes tiempos de tratamiento con sulfonato etilmetílico.

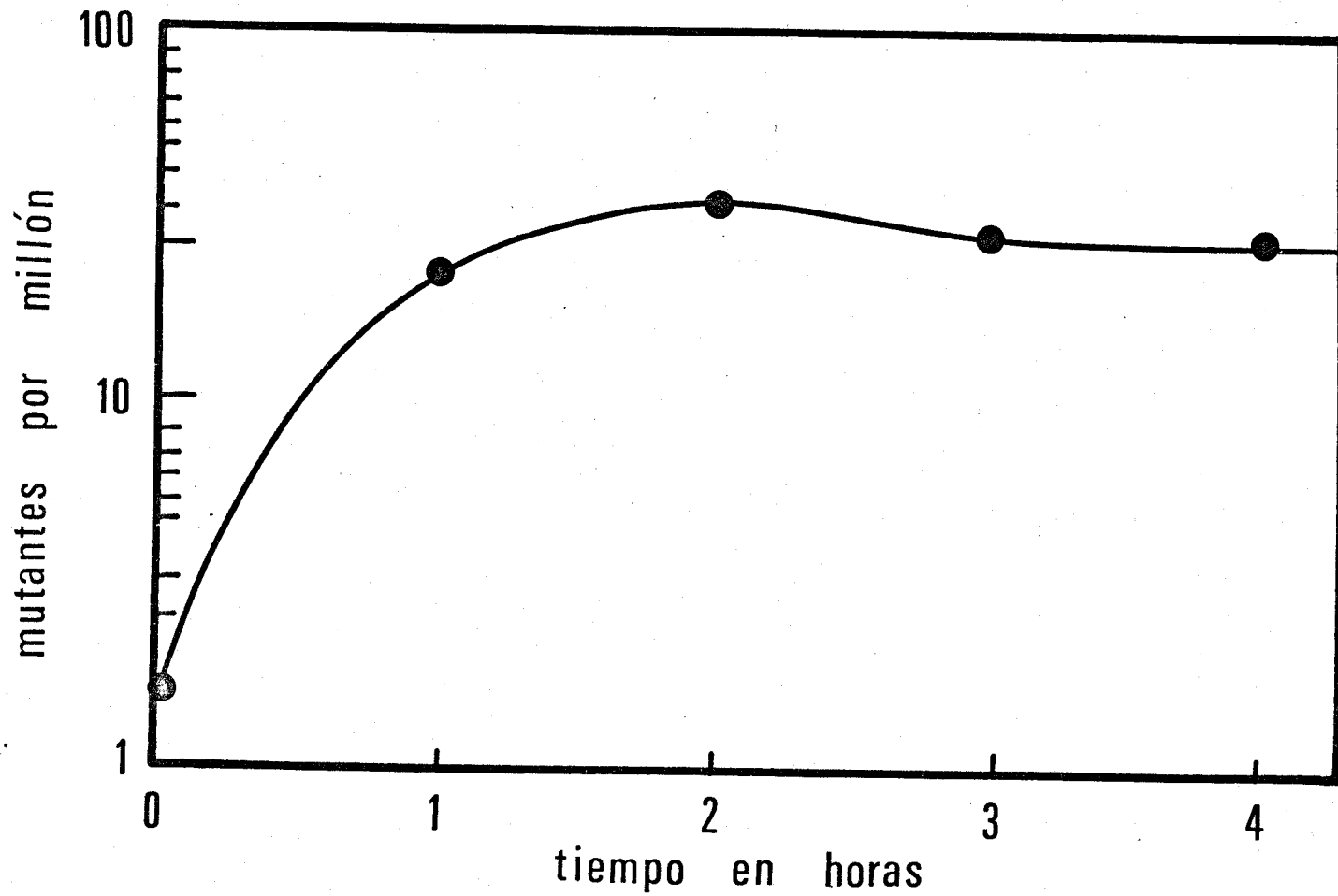


E. coli SE35, proveniente de cultivo exponencial en medio líquido, fue mutagenizada con EMS 0,1M a pH 7,2 y diferentes tiempos para hallar el óptimo de supervivencia junto con la frecuencia de reversión a leu⁺. La Figura 4-2 nos muestra la supervivencia de SE35, de donde se deduce que a los 10 minutos de tratamiento hay una supervivencia del 90% de las células con un considerable aumento en la mutagénesis.

4.2 Cinética de la aparición de mutaciones tras el tratamiento con sulfonato etilmetílico.

Como vimos al tratar de la nitrosoguanidina la expresión de la mutación de resistencia a la azida de sodio necesita de un tiempo de recrecimiento entre la mutagenesis y la detección; hay que fijar la mutación y sintetizar nuevas estructuras celulares resistentes a la droga. Por eso determiné el tiempo de recrecimiento óptimo, ya que podría ser diferente del determinado para la nitrosoguanidina (Figura 4-3). Inmediatamente al tratamiento hay ya una frecuencia apreciable de mutantes resistentes a azida (1,8 por millón) que va creciendo con el tiempo y a las dos horas alcanza su valor máximo.

FIGURA 4.3 Cinética de aparición de mutantes resistentes a la azida de sodio en la estirpe SE1 tras el tratamiento con sulfonato etilmetílico e incubación en caldo nutritivo por el tiempo expresado en abscisas.



Las mutaciones de reversión a leu⁺ en SE35 no necesitan de un tiempo de recrecimiento como comentamos anteriormente.

4.3 Distribución de las mutaciones inducidas por sulfonato etilmetílico.

Para averiguar si el sulfonato etilmetílico tiene una tendencia a producir mutaciones dobles ligadas por su acción sobre un segmento pequeño del cromosoma, se sigue el mismo procedimiento experimental que con la luz ultravioleta y la nitrosoguanidina. Los resultados con la estirpe SE1 aparecen en la tabla 4.1 y llevan a la conclusión de que no existe una tendencia de las mutaciones Azi^r a ir acompañadas de mutaciones leu⁻ y por tanto el sulfonato etilmetílico no tiene una preferencia similar a la de nitrosoguanidina por mutagenizar un segmento del cromosoma.

De todos modos, como las colonias resistentes a azida después del sulfonato etilmetílico no eran suficientemente homogéneas (diferentes tamaños, crecimiento irregular) comprobé este

mismo resultado en otro sistema genético: las reversiones Leu^+ de la estirpe SE35 son mucho más homogéneas y al estudiar comutación para el gen próximo ara, tampoco dieron una preferencia alta de dobles mutantes (Tabla 4.2).

Concluimos pues, que el tratamiento con sulfonato etilmetílico no da un efecto de comutación similar al obtenido con nitrosoguani-
dina, sino que dentro del grado de resolución alcanzable en estos experimentos las mutaciones aparecen distribuidas al azar.

TABLA 4.1 Escherichia coli, SE1, tratada con EMS 0,1M durante 10 minutos. Las colonias mutantes, resistentes a la azida de sodio fueron probadas en distintos medios para detectar auxótrofos en general y auxotrofos para la leucina y la histidina.

Experimento	Células tratadas	Fracción super-viviente	Mutantes <u>azi</u> por 10^6	Colonias <u>azi</u> probadas	Auxótrofos		
					Total	<u>leu</u>	<u>his</u>
1	3.4×10^9	0'059	30	300	25	0	0
2*	6.4×10^8	0'375	35	200	1	0	0
3	2.0×10^9	0'010	31	1047	57	1	0

* Duración del tratamiento, 8 minutos.

TABLA 4.2. Escherichia coli, SE35, tratada con EMS 0,1M. Las colonias revertientes Leu⁺ fueron probadas en medio con arabinosa para detectar frecuencia de dobles mutaciones.

N° exp.	Cel. tratadas por ml.	Cel. después tratamiento por ml.	Superv.	Mut. por millón	Col. Leu ⁺ probadas	Ara ⁻	His ⁻
B ₅₁ (10 min)	1.0x10 ⁷	7.0x10 ⁶	0.7	37.1	300	0	0
B ₅₅ (10 min)	1.16x10 ⁹	4.4x10 ⁸	0.38	2	836	1	0
B ₅₉ (10 min)	8.0x10 ⁸	5.50x10 ⁸	0.69	1.6	600	0	0
B ₅₉ (20 min)	8.0x10 ⁸	1.0x10 ⁸	0.13	1.4	300	0	0
B ₆₀ (10 min)	1.52x10 ⁹	1.7x10 ⁸	0.11	1.4	900	0	0
B ₆₁ (20 min)	1.30x10 ⁹	7.2x10 ⁷	0.55	3.6	300	0	0
B ₆₂ (10 min)	1.77x10 ⁹	7.56x10 ⁸	0.43	1.0	<u>1,000</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
TOTAL					4,236	1	0
B ₅₈ (control, sin seleccionar para Leu ⁺)	1.62x10 ⁹	1.90x10 ⁹	0.67		Colonias probadas 1,150	0	1

EFFECTO DE LA NITROSGUANIDINA SOBRE UN MUTANTE PRODUCTOR
DE POLIMERASA III TERMOSENSIBLE

CAPITULO 5

EFFECTO DE LA NITROSOGUANIDINA SOBRE UN MUTANTE PRODUCTOR DE POLIMERASA III TERMOSENSIBLE

5.1 Crecimiento en medio mínimo.

La estirpe E486 lleva una mutación en el gen dnaE, resultante en la producción de una polimerasa III termosensible (Gefter et al., 1971) y ocasiona el cese inmediato en la replicación del ADN al elevar la temperatura a 42°C (Wechsler y Gross, 1971). A 30°C el mutante es capaz de replicar el ADN y forma colonias normales. Cada generación en medio mínimo y con aireación forzada requiere aproximadamente dos horas a la temperatura de 30°C (Fig. 5.1).

Para nuestros experimentos, se obtuvo un cultivo de esta estirpe a 30°C, en fase logarítmica y se dividió en dos partes, una de las cuales se trató a 30°C con nitrosoguanidina (100 µg/ml, pH 5.5 durante 30 minutos y a la otra a 40°C en las mismas condiciones. Se determinó la frecuencia de revertientes Leu⁺ inmediatamente después del tratamiento y la frecuencia de auxotrofos tras una nueva incubación a 30°C.

La Figura 5.1 nos indica la evolución del cultivo durante el experimento medida por turbidez a 450 nm y la Tabla 5.1 da los resultados de supervivencia y aparición de mutantes. Los resultados indican que se producen mucha más mutaciones si el tratamiento se hace a 30°C que si se hace a 40°C; la diferencia en proporción de auxotrofos es significativa al nivel de $p < 10^{-5}$ (test t, previa transformación arco seno).

La diferente mutabilidad a ambas temperaturas es consecuencia de la presencia de la mutación dnaE486. Para demostrarlo se seleccionaron revertientes espontaneos Dna^+ , es decir capaces de formar colonias a 40°C. Se aisló uno de ellos, se le denominó estirpe SE36 y se repitió con el mismo experimento anterior. Los resultados (Tabla 5.2) demuestran que su mutabilidad no es mayor a 30°C que a 40°C.

5.2 Curva de crecimiento siguiendo el tratamiento con nitrosoguanidina.

En la Figura 5.1 se aprecia, después del tratamiento con nitrosoguanidina que las curvas de crecimiento correspondientes a los cultivos A (tratamiento con nitrosoguanidina a 30°C) y B (tratamiento con nitrosoguanidina a 40°C) son bastante diferentes en el comienzo. A 40°C el tiempo de recuperación es mayor, indicando que probablemente resultó más afec-

tado por el tratamiento, teniendo que hacer síntesis nueva de polimerasa III antes de comenzar un crecimiento exponencial.

FIGURA 5.1. ○ Crecimiento del mutante dnaE486 en medio líquido mínimo antes del tratamiento con nitrosoguanidina.

● Crecimiento en medio líquido nutritivo después del tratamiento con nitrosoguanidina a 30°C. ▲ Crecimiento en medio líquido nutritivo después del tratamiento con nitrosoguanidina a 40°C.

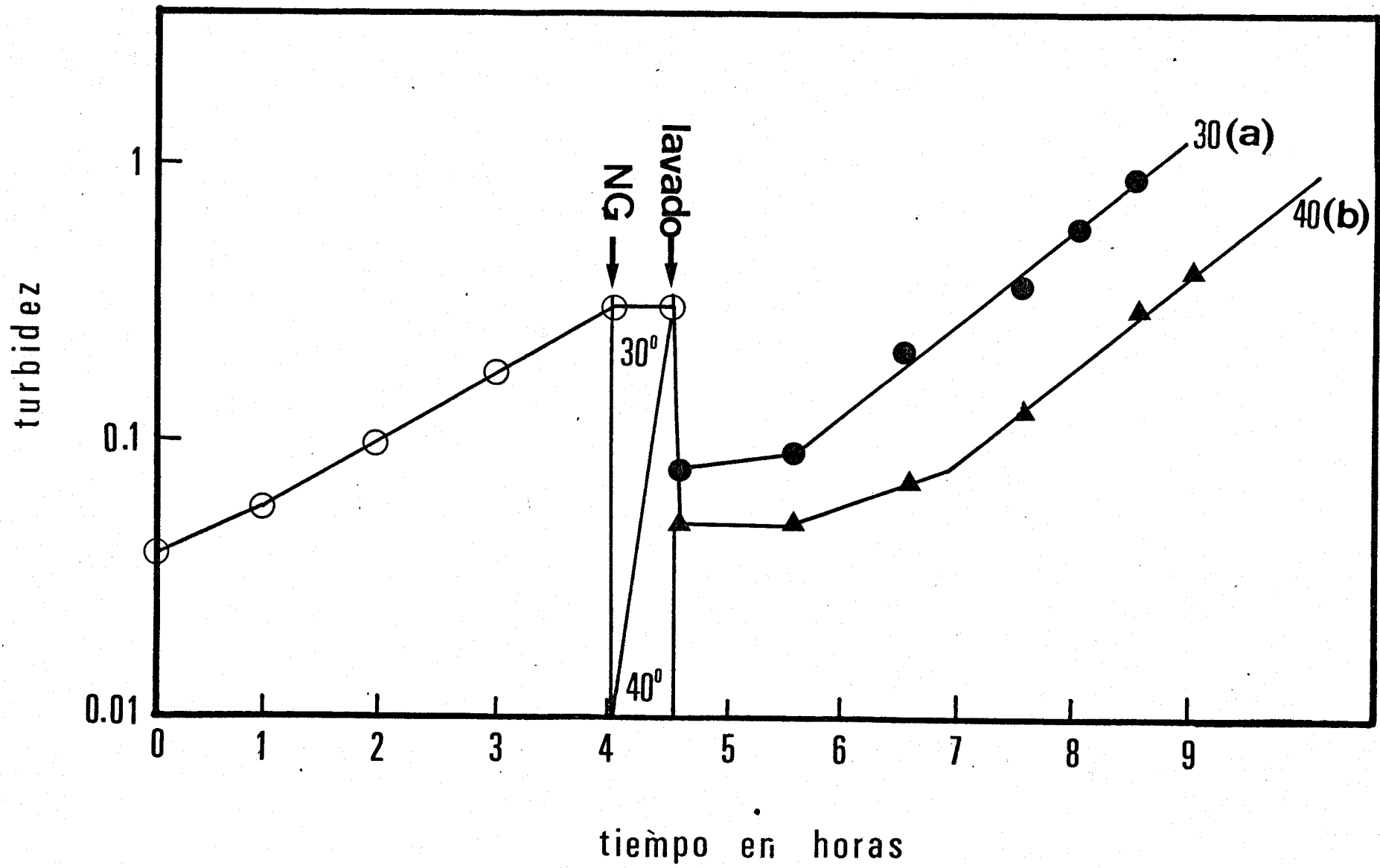


TABLA 5.1. Mutaciones inducidas por nitrosoguanidina en el mutante E486: (a) Suma de cuatro experimentos de mutagenesis para obtención de auxotrofos. Las colonias resultantes se consideraron "auxotrofos" si eran incapaces de crecer en medio mínimo con los suplementos de la estirpe parental. La diferencia entre las frecuencias de auxotrofos obtenidos a 30°C y a 40°C es significativa ($P < 10^{-5}$). (b) y (c) Resultados obtenidos en dos experimentos diferentes donde una alícuota del cultivo fue sembrada inmediatamente después del tratamiento en agar mínimo sin leucina, para estudio de la reversión a Leu^+ . La frecuencia de mutación espontánea para este gen fue menor de 10^{-7} en cultivos sin tratar.

Tabla 5.1 Mutaciones inducidas por nitrosoguanidina en el mutante E 486

	Temperatura tratamiento	
	30°C	40°C
(a)		
Supervivencia	0.52 - 0.77	0.21 - 0.61
Colonias probadas para auxotrofos	1850	2300
Auxotrofos	34	8
% de auxotrofos	1.84	0.35
(b)		
Supervivencia	0.72	0.28
Mutantes revertientes Leu ⁺ (por millón)	13.9	2.4
(c)		
Supervivencia	0.62	0.62
Mutantes revertientes Leu ⁺ (por millón)	13.5	1.4

TABLA 5.2. Mutaciones inducidas por nitrosoguanidina en un mutante revertiente espontáneo Dna^+ . La diferencia en frecuencia de auxotrofos y revertientes Leu^+ no es significativa.

Tabla 5.2 Mutaciones inducidas por nitrosoguanidina en un revertiente espontáneo Dna⁺

	Temperatura del tratamiento	
	30°C	40°C
Supervivencia	0.73	0.33
Colonias probadas para auxotrofos	800	800
Auxotrofos	8	7
% auxotrofos	1.0	0.9
Mutantes revertientes Leu ⁺ (por millón)	6.2	7.6

DISCUSION

DISCUSION

6.1 Comutación

Los resultados demuestran que los genes próximos en el mapa genético tienden a mutar simultáneamente con frecuencia mucho mayor de la esperada por azar, tras el tratamiento de E. coli con nitrosoguanidina. Así por ejemplo las colonias resistentes a la azida presentan mutaciones que inactivan los grupos de genes leu y ara, próximos a azi, con una frecuencia relativamente elevada, del 3.3% a 2.5%, respectivamente. Por el contrario la frecuencia de mutaciones en los grupos de genes ilv, his y phe, alejados de azi, es menor de la esperada por azar.

La alta frecuencia de mutaciones en los genes cercanos a azi no es una propiedad inherente a estos genes ya que si la población mutagenizada no se selecciona para azida, se obtiene una distribución de mutaciones muy diferente, de modo que las frecuencias de mutaciones que inactivan leu y ara son incluso ligeramente inferiores a las correspondientes de his.

La comutación afecta a genes que se encuentran a distancias de hasta 1.5 - 2 minutos en el mapa genético, según se observa en la Figura 2.3. Esta región hipersen-

sible está asociada al punto de replicación del cromosoma, según demostraron Cerdá Olmedo et al. (1968).

El análisis matemático de resultados numéricos concluye (Guerola et al., 1971) que el 80% de las mutaciones inducidas por la nitrosoguanidina en células en crecimiento activo se encuentran en las regiones hipersensibles asociadas a la replicación, mientras que sólo el 20% se dispersa por todo el resto del cromosoma. Como las regiones hipersensibles son comparativamente pequeñas, se puede concluir que un gen tiene una probabilidad de mutar 4 veces mayor si se encuentra dentro de la región supersensible que si está fuera. Si la sensibilidad a la mutación es uniforme a lo largo de la región hipersensible, se espera que la frecuencia de mutaciones dobles decrezca linealmente con la distancia entre los genes, tal y como parece observarse en la Figura 2.3

El cromosoma de Escherichia coli tiene unos 4,000,000 pares de nucleótidos y su mapa genético mide 90 minutos. Un gen de tamaño medio de 1,000 pares de nucleótidos, ocupará aproximadamente $90/4000 = 0,022$ minutos, y un grupo de cuatro o cinco genes, como leu o ara, ocupará aproximadamente 0'1 minutos.

Cualquiera que sea la distribución de las mutaciones en la región hipersensible, se espera teóricamente que las

frecuencias de comutación sean parecidas a ambos lados de azi. De la Figura 2.3 se puede aceptar que la probabilidad de inactivar la función de un grupo de tales genes varía linealmente de 3.3% para genes próximos al seleccionado hasta 0% para genes a 1.6 minutos. El total de mutaciones similares inducidas en todos los genes de la región hipersensible, al seleccionar un gen determinado será de $2 \cdot \frac{3.3\% \cdot 1.6}{0.1 \cdot 2} \approx 50\%$.

Concluimos que un 50% de los mutantes azi inducidos por nitrosoguanidina tiene otra mutación en el mismo cromosoma, a una distancia de menos de 1.6 minutos de la primera, codificando cambios suficientemente radicales para ser detectados como auxótrofos si ocurren en enzimas biosintéticas.

La nitrosoguanidina induce principalmente sustituciones de una base del ADN por otra. Se ha demostrado que solamente un 1% de los cambios en el gen hisC de Salmonella typhimurium resultan en mutación auxótrofa detectable (Whitfield et al., 1966). Si la detectabilidad de las mutaciones en la región que nos ocupa es similar a la de hisC⁺, cada célula que ha recibido una mutación azi inducida por nitrosoguanidina lleva probablemente unos 50 cambios de base en las inmediaciones.

Hemos observado comutación en leu seleccionando mutaciones en ara y comutación en ara seleccionando mutaciones en leu. Esta reciprocidad de la comutación era sin duda de esperar y es verificada experimentalmente (Capítulo 2 de Resultados).

Posteriormente a nuestro descubrimiento de la comutación y su difusión se ha comprobado la comutación de otros genes en E. coli, como el factor F y los genes para la utilización de lactosa (Lloveres y Cerdá Olmedo, 1973), los genes para fosfatasa alcalina y los genes para utilización de lactosa (Hohlfeld, 1973, comunicación personal), entre los genes de la ruta de la arginina (Lloveres, 1974), en Salmonella typhimurium (genes de la ruta de la histidina, (trabajo de J.L. Ingraham en Guerola et al., 1971), en Pseudomonas putida, genes de la ruta de la arginina (Torres, 1974) y en Streptomyces coelicolor, genes de la ruta de la histidina (Randazzo et al., 1973) y de la reducción del nitrato (Carere et al., 1973).

Debemos concluir por tanto que la comutación es un fenómeno general, al menos en procariontes. La reciente repetición de los experimentos de Cerdá Olmedo et al., (1968) usando Saccharomyces cerevisiae (Dawes y Carter, 1974), sugiere que el mismo fenómeno se debe dar en eucariontes. De hecho los resultados de la Tabla 3 del trabajo de

Malling y de Serres (1970) pueden interpretarse como apoyo a la existencia de comutación en Neurospora crassa.

Como consecuencia del fenómeno de comutación puede definirse como índice de comutación de dos genes la relación entre la frecuencia de mutaciones dobles en la población seleccionada para mutación en uno de los genes a la frecuencia de la otra mutación en la población no seleccionada. Este índice es también la relación de la frecuencia de mutantes dobles al producto de las frecuencias de los correspondientes mutantes simples. Este índice sería mayor que 1 cuando los genes estuvieran a menor distancia que la longitud de la región hipersensible, y menor que 1 para genes más alejados. Así, según los datos de la Tabla 2.1, este índice vale 15 para azi y leu y 0.4 para azi y his. La comutación ofrece una técnica muy sensible para construir mapas genéticos de pequeños segmentos del cromosoma, técnica que se puede usar de manera análoga a la cotransducción. En conjunción con la mutagénesis secuencial en cultivos sincronizados permitirá la elaboración de mapas cromosómicos de organismos asexuales. Ello puede tener una transcendencia muy grande en biología aplicada, porque la principal dificultad para la manipulación artificial de las bacterias de interés médico e industrial es la inexistencia en ellas de fenómenos conocidos de sexualidad que permitan el análisis genético clásico.

Si dos genes tienden a mutar simultáneamente con nitrosoguanidina, es muy probable que estén próximos en el cromosoma, pero cabe imaginar este fenómeno entre algunos genes alejados. Así, por ejemplo, si el cromosoma se replica bidireccionalmente comenzando en un punto fijo y avanzando a la misma velocidad los dos puntos de replicación, los genes replicados simultáneamente por los dos puntos de replicación podrían exhibir comutación. También cabe pensar que si hay varios cromosomas (o un cromosoma y un plásmido) que se repliquen simultáneamente según un programa fijo, podría encontrarse comutación entre genes de distintos cromosomas. La comutación entre genes alejados es todavía desconocida experimentalmente, pero no ha sido buscada intensamente.

La comutación impide asegurar que el genotipo de un mutante aislado tras tratamiento con nitrosoguanidina es a consecuencia de una sola mutación. No se puede excluir la presencia de otra mutación en un gen cercano, ni siquiera si se ha tomado la precaución de transducir el carácter a una estirpe no tratada. Deben ponerse en duda las interpretaciones ofrecidas hasta ahora del fenotipo de mutantes aislados obtenidos con nitrosoguanidina. Para obtener resultados convincentes habrá que estudiar varios mutantes parecidos y sus revertientes.

La existencia de comutación ofrece la posibilidad de aislar ciertos mutantes que no se pueden seleccionar. Para ello seleccionaríamos la ocurrencia de mutaciones en genes próximos; entre ellos esperamos encontrar una frecuencia de 1% de mutaciones en el gen deseado, frecuencia suficientemente alta para su detección sin técnicas selectivas. Esta frecuencia se refiere a cambios suficientemente drásticos como para resultar en auxotrofismo si se tratara de enzimas biosintéticas; los cambios más sutiles, detectables por técnicas como electroforesis o cromatografía de proteínas, deben ser mucho más frecuentes.

6.2 Distribución aleatoria de las mutaciones inducidas por luz ultravioleta y sulfonato etilmetilico.

Ninguna característica química de la nitrosoguanidina hace predecir que vaya a tener una acción específica sobre regiones en replicación. Cabe pensar que otras mutágenos, físicos o químicos, pudieran tener un efecto parecido para lo cual hemos investigado los efectos de la radiación ultravioleta y del sulfonato etilmetilico, dos mutágenos muy usados, para detectar comutación.

La luz ultravioleta es bastante menos mutagénica que la nitrosoguanidina y mucho más letal. Los experimentos demuestran que no posee una preferencia similar a

la de la nitrosoguanidina para producir mutaciones dobles muy próximas. Por tanto se puede emplear la luz ultravioleta en la obtención de mutantes con una probabilidad muy baja de presentar otras mutaciones en una zona próxima a la mutación que nos interesa.

El sulfonato etilmetílico es un agente mutagénico poderoso aunque menos que la nitrosoguanidina y más tóxico. Nuestros resultados no han podido revelar una incidencia significativa de comutación por lo que la distribución de sus mutaciones debe ser mucho más homogénea sobre el genoma del organismo tratado que la de las producidas por nitrosoguanidina. En consecuencia el sulfonato etilmetílico es un agente mutagénico adecuado para obtener mutantes que no presentan otras mutaciones a genes próximos.

Queda claro por tanto que la comutación no es una propiedad general de los mutá genes sino una propiedad particular de la nitrosoguanidina y tal vez de otros mutagénos con grupo nitroso activo como la N-metil-N-nitrosourea, "nitroso metano" y "nitrosocarbarilo".

6.3 Mecanismo de acción de la nitrosoguanidina

La metilación por la nitrosoguanidina de muchas moléculas orgánicas, incluidas las ácidos nucleicos ha

hecho suponer que su acción mutagénica sería parecida a la de otras agentes metilantes, como por ejemplo el sulfonato etilmetílico.

Los resultados de los Capítulos 2 y 4 indican, sin embargo, una diferencia fundamental entre la acción de ambos mutágenos: las mutaciones producidas por el sulfonato están distribuidas de manera aparentemente aleatoria sobre todo el genomio, como sería de esperar de un agente que reacciona directamente sobre el ADN, mientras que las producidas por nitrosoguanidina está concentradas en pequeñas regiones asociadas a la replicación del cromosoma.

Los resultados descritos en el Capítulo 5 son casi imposibles de explicar si la nitrosoguanidina actuará directamente sobre el ADN. Nada le impediría en tal caso actuar a 40°C sobre el ADN del mutante productor de una polimerasa III termosensible. Los resultados indican, por el contrario, que la mutagénesis necesita la existencia de polimerasa III activa durante el tratamiento, por ejemplo, bajando la temperatura de 40°C a 30°C después de lavar la nitrosoguanidina.

Kimball (1970) y Kimball y Setlow (1973) han sugerido que la nitrosoguanidina causa daños premutacionales en todo el cromosoma, es decir alteraciones químicas del ADN que

pueden ser convertidas en mutaciones durante la replicación pero que podrían ser reparadas por el mecanismo de la reparación. La acción específica sobre la región en replicación sería explicada por competición entre replicación y reparación, de modo que el mecanismo de reparación actuaría en todas las regiones que no fueran replicadas inmediatamente después del tratamiento.

Este resultado, sin embargo, es incompatible con la observación de que la mutagenesis no varía en condiciones distintas de reparación debidas a defectos genéticos o a circunstancias ambientales (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968; Malke, 1968; Yoshida y Yuki, 1968).

La nitrosoguanidina alteraría la polimerasa III de la célula de modo que ésta, al intentar continuar la replicación, se equivocaría en la elección de bases y produciría mutaciones. Las moléculas alteradas de polimerasa III no replicarían indefinidamente el cromosoma, sino que actuarían sobre una región determinada, antes de ser reemplazadas por moléculas normales, recién sintetizadas.

Si la polimerasa se destruye por exposición a 40°C, y no se recupera su configuración activa al disminuir la temperatura a 30°C, no deberían encontrarse mutaciones. Las

pocas mutaciones observadas en tal caso (Tabla 5.1) sería resultado directo de la interacción entre nitrosoguanidina y ADN o de la nitrosoguanidina que quedase en la célula después de los lavados.

Puesto que la nitrosoguanidina aplicada en la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ provoca el cese inmediato de la replicación (Guerola et al., 1971) y aun a 1 $\mu\text{g/ml}$ la inhibe grandemente (Jiménez, 1974), las mutaciones no deben ser inducidas durante el tratamiento, sino al intentar reanudar la replicación al final del mismo.

La hipótesis de que la nitrosoguanidina causa mutaciones alterando a una polimerasa del ADN fue propuesta por primera vez por Cerdá Olmedo y Hanawalt (1967). Los resultados de este trabajo concuerdan satisfactoriamente con los hechos conocidos sobre la acción de la nitrosoguanidina.

La nitrosoguanidina es muy poco mutagénica si se aplica en ácidos nucleicos aislados (Freese y Bautz-Freese, 1966) o si se aplica a un cultivo de una bacteria transformable y el ADN se extrae a continuación, utilizándose para transformar un cultivo similar no tratado, y se observa la aparición de mutaciones en este (Kimball y Setlow, 1974).

Si se tratan con nitrosoguanidina células de bacterias, se induce mutaciones a fagos no tratados que infectan a las células tratadas (Kondo e Ichikawa, 1973).

La acción de la polimerasa III es necesaria para el apareamiento correcto de las bases durante la replicación, según exige la hipótesis sobre acción de la nitrosoguanidina. Se ha comprobado que varios mutantes dnaE productores de polimerasa III termosensible presentan, a la temperatura permisiva, un ligero aumento en la aparición de mutantes espontáneos (Hall y Brammar, 1973). La responsabilidad de las polimerasas del ADN en la fidelidad de la replicación es conocida desde que Speyer (1965) descubrió que un "gen mutador" del fago T4 es en realidad una forma mutada de la polimerasa del ADN del fago, que tiene una pronunciada tendencia al error.

Para investigaciones futuras debe sugerirse el estudio detallado de la mutagenicidad de la nitrosoguanidina en los numerosos mutantes de E. coli que presentan alteraciones en la replicación, incluyendo otros mutantes dnaE, el estudio de la estabilidad in vivo de las polimerasas III termosensibles, y el estudio in vitro de la fidelidad de la polimerasa III previamente tratada con nitrosoguanidina.

MATERIALES Y METODOS

A. ESTIRPES BACTERIANAS

Escherichia coli SE1, proviene de E. coli tau bar nombrada así por P. C. Hanawalt de Stanford y requiere para vivir timina (2 µg/ml), uracilo (8 µg/ml) y los aminoácidos arginina, metionina y triptofano (20 µg/ml). El SE1 no requiere prolina a diferencia de la estirpe de la cual proviene por pérdida espontánea de dicho requerimiento. El Dr. Gotz introdujo el requerimiento timina y el Dr. Weatherwax los de arginina, prolina y triptofano. Finalmente el Dr. Wax introdujo el de uracilo. Es bastante resistente a la irradiación ultravioleta (supervivencia del 37% a una dosis de 60 erg/nm² y a 260 nm. Posee mecanismo de reparación a los daños por luz ultravioleta (Pettijohn y Hanawalt, 1964). No tiene flagelos, por lo que se cae al fondo del tubo cuando no se agita.

Escherichia coli SE35 es un derivado Leu⁻ de B/5 obtenido por mutagenesis con nitrosoguanidina y selección con penicilina como se describe en el capítulo de materiales y métodos. Requiere leucina

para vivir y crece normalmente en arabinosa.

Escherichia coli SE40 deriva también de B/5 por tratamiento con nitrosoguanidina y selección con penicilina. Es protótrofo pero incapaz de vivir en arabinosa al contrario de la cepa de la cual deriva.

Escherichia coli SE486, además de requerir timina, leucina, treonina y tiamina, es incapaz de vivir en lactosa como fuente de carbono y es resistente a la estreptomicina y al fago T1. Fue aislado por el Dr. Goldfine a partir de una estirpe CR34 por tratamiento con sulfonato etilmetílico y seleccionado por su incapacidad de crecer a 42°. Más tarde (Wechsler, 1971) lo caracterizó como incapaz de replicación del ADN a 42°, debido a la mutación dnae486. Tiene asignado un número de estirpe siguiendo las normas de nomenclatura genética aceptadas (Demerec et al., 1966).

Escherichia coli SE36 procede del anterior E486, por pérdida espontánea de la termosensibilidad a 40° C.

B. TAMPONES .

a) Tampón tris-maleato. Se prepara mezclando 50 ml de solución A y cantidades variables de solución B según el pH deseado. Para un pH de 5,5, 13,1 ml de solución B, 26 ml para pH 6, 19,7 ml para pH 6,5, 48 ml para pH 7, y 56 ml para pH 7,5. Se completa con agua destilada hasta 200 ml de volumen total.

Solución A: 24,2 g/l tris (hidroximetil) aminometano, más 23,2 g/l ácido maleico.

Solución B: 0,2 M hidróxido sódico.

b) Tampón M9. Se prepara mezclando 100 ml de solución concentrada 10 veces M9 (formula mas abajo), 10 ml de sulfato magnesico 0,1M, 10 ml de cloruro calcico 0,01M y 880 ml de agua destilada estéril.

Solución M9 (concentrada 10 veces):

60 g. de PO_4HNa_2 , 30 g. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 5 g. de ClNa , y 10 g. de ClNH_4 , y completar con H_2O destilada hasta 1000 ml. Disolver en el orden indicado. Esterilizar a 15 lb. 15 minutos.

c) Tampón Tris-sales. Para preparar el tampón tris-sales se disuelven 120 g. de tris (hidroximetil-aminometano) en 500 ml de agua destilada. Aparte se prepara otra solución conteniendo 75 ml de ClH concentrado, 20 g. de ClK, 20 g. de ClNH₄, 6,6 g. de PO₄HNa₂ y 3.5 g. de SO₄NA₂ en 400 ml de agua destilada y se mezcla con la solución anterior. Tenemos entonces la solución A. La solución B está compuesta de 5 g. de Cl₂Mg.6H₂O disueltos en 100 ml de agua destilada.

La solución final se prepara con 90 ml de solución A, 900 ml de agua destilada y 10 ml de solución B en este orden. Si la preparación es lo bastante exacta el pH resultante es de 7.4, pero si varia ligeramente hay que ajustarlo con ClH o NaOH a 7.3 antes de autoclavar.

C. MEDIOS DE CULTIVO.

Para obtener los cultivos en fase de crecimiento exponencial, se usó medio mínimo líquido a menos que se indique otra cosa. El medio mínimo consistió en tampón tris-sales a pH = 7,4, adicionado de 0,2% de glucosa y los aminoácidos y vitaminas requeridos por cada estirpe en particular. Cuando se necesitaba el medio con lactosa o arabinosa se empleó la misma concentración que para glucosa, o sea el 0,2%.

El agar mínimo se obtuvo añadiendo 25 g de agar (Bacto-Agar, Difco) a cada litro de medio mínimo antes de clavarlo.

El medio nutritivo o rico se conoce con el nombre de caldo de Luria. Consta de 10 g de triptona, 5 g extracto de levadura (ambos de Difco, Detroit, Mich., USA) y 10 g de cloruro sódico en 1 litro de agua destilada y corregido el pH hasta 7,2 antes de esterilizarlo en autoclave.

La enumeración de células vivas se hizo en cajas de Petri con agar nutritivo, es decir, medio de Luria conteniendo 25 g/l de agar (Bacto-

Agar, Difco).

La enumeración de mutantes resistentes a una droga como estreptomicina o azida de sodio, se hizo en agar nutritivo adicionado de 100 mg/l de estreptomicina y 250 mg/l o 125 mg/l de azida de sodio, respectivamente.

Los mutantes con algún requerimiento auxotrófico cuya reversión se quería estudiar, se sembraron en agar mínimo sin el correspondiente aminoácido.

Cuando se requería almacenar estirpes durante un período de tiempo de varios meses, se preparó agar nutriente de conservación que se compone de 10 g. de Bacto-Tryptone Difco, 5 g. de D-glucosa y 10 g. de agar Difco en un litro de tampón tris-sales. Este medio después de autoclavado se vierte en frascos pequeños color topacio con tapón de rosca. Después de sembradas en picadura las estirpes, se tapan las posibles aberturas del tampón de rosca con cera derretida o bien con papel encerado para evitar desecación.

D. Productos químicos.

Nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina) fue comprada de Koch and Light, Colnbrook, Inglaterra. Se disuelve en la proporción de 1 mg/ml y se conserva congelada en dosis de 0,5 ml en el congelador.

Sulfato de estreptomina. Fue añadido al medio nutritivo a la concentración de 0,1 g por litro cuando la temperatura había bajado hasta unos 45°C.

Azida de sodio. La azida de sodio fue añadido a la concentración de 0,25 y 0,125 gramos por litro al medio nutritivo cuando la temperatura de éste era de 45°C.

Los Aminoácidos que requerían las diferentes estirpes se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA.

Sulfonato etilmetílico fue obtenido de Koch and Light, Colnbrook, Inglaterra.

II. METODOS

1. CRECIMIENTO DE CULTIVOS

A) Cultivos en medio liquido.

Ha sido suficientemente observado que las células bacterianas responden de forma diferente a las agentes mutagenicos según su estado fisiológico. Las bacterias que están en reposo producen menos mutantes y una mayor supervivencia en comparación con sus semejantes que se se dividen activamente. Es esencial entonces para nuestros experimentos homogenizar las condiciones de cultivo al máximo, de forma que introduzcamos el menor número de variables posibles en cada experimento diferente. Para conseguir, pues, que todas las células estuviesen en crecimiento activo en el momento de la mutagenesis, se tomó con una asa de siembra una pequeña porción de bacterias provenientes todas de una misma colonia aislada y se incubó durante la noche en medio mínimo y a 37°. Al día siguiente se diluyó este cultivo 1:100 y se dejó crecer hasta una densidad óptica de 0.2 a 0.3. Como la densidad óptica de la fase estacionaria está alrededor de 1 (se utiliza un tubo de 17,4 nm) esto quiere decir que la mayor parte de las bacterias en el cultivo se encuentra en fase de creci-

miento activo. La densidad óptica se mide en un aparato Spectronic Bausch and Lomb, a 450 nm, de longitud de onda.

Cuando era necesario cambiar el medio de cultivo se utilizó una centrifuga Wifug durante 5 minutos a 5,000 r.p.m. Para mutagenizar se lavó dos veces, tirando el sobrenadante y añadiendo el tampón o el medio de cultivo necesario en cada caso. Para volúmenes mayores de 10 ml se utilizó filtros Millipore aplicando succión de bomba de vacío. También se lavó dos veces consecutivas antes y después de cada tratamiento.

B) Cultivos en medio sólido.

Cuando se quería obtener colonias aisladas, se sembró una parte determinada del cultivo, previas las diluciones necesarias para obtener unas 200 colonias por caja de Petri, en medio previamente solidificado con agar al 2.5%. Esta parte diluida o no del cultivo original se esparció con una varilla de zero inoxidable esterilizado.

Las bacterias que se utilizaron para conteos se sembraron en agar de Luria con lo que crecían muy deprisa y eran observables a las 24 horas. Las bacterias que habían sufrido una mutación y por tanto eran sembradas en medio mínimo sin el requerimiento o bien las bacterias mutantes de resistencia a drogas

(estreptomycin o azida) que se sembraran en agar rico de Luria adicionado con el inhibidor, se observaron a las 48 horas.

2. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA

A) Preparación de solución de nitrosoguanidina.

La solución de nitrosoguanidina se prepara pesando x mg. del compuesto y disolviendolos en otros tantos ml de agua destilada estéril. Obtendremos así una solución concentrada de 1 mg/ml cuya densidad óptica a 400 nm debe ser 1 en una cubeta "standard" de Spectofotometro Beckman. Dicha solución se divide en partes de 0.5 ml, se congela y se guarda a -20 grados C, envuelta en papel de estaño, puesto que es muy sensible a la luz y se descompone facilmente cuando está en solución.

Cuando se necesitaba para su uso, se descongeló inmediatamente antes de usarla y en ningún caso se volvió a congelar. El sobrante de cada experimento junto con el material utilizado, se sumergieron en una solución fuertemente alcalina que, como hemos indicado anteriormente, descompone rapidamente la nitrosoguanidina, eliminando de esta forma una posible acción cancerígena de contaminación.

B) Mutagenesis con nitrosoguanidina.

Las células del cultivo en fase de crecimiento activo separadas del (0.2 de densidad óptica que corresponde a 10^8 células por ml) medio de crecimiento

por centrifugación o filtración, se lavaban dos veces y se resuspendían en el tampón adecuado. La nitrosoguanidina, descongelada inmediatamente antes del uso para evitar descomposición por el calor y la luz, se añadió a las bacterias en concentraciones de 0,01 mg/ml durante 30 minutos sin aireación y teniendo todo el proceso a 37°. El tubo se envolvió en papel de estaño para evitar descomposición de la nitrosoguanidina por la luz durante el tiempo de tratamiento.

3. TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA

El cultivo, después de recrecido en medio mínimo hasta una densidad óptica de 0,3 a 0,4 (10^8 células por ml) o sea en fase de crecimiento exponencial, se centrifuga o filtra para cambiar el medio y sustituirlo por tampón, de forma que los productos de descomposición del medio después del tratamiento no interfieran con la mutagenesis propiamente dicha. Las células resuspendidas en 10 ml de Tampón Tris-sales se expusieron a la acción de los rayos ultravioleta emitidos por una lámpara germicida 615T8 de 15 w que produce más del 99% de su emisión a 254 nm. Los tratamientos tuvieron lugar en una caja de Petri abierta, con agitación, previamente calentado el filamento durante una hora y a 50 cm de distancia del cultivo; cuando se trataba de mutaciones de resistencia a drogas, se centrifugaba y resuspendía

en medio completo de Luria para que se expresara la mutación evitando en lo posible la presencia de luz visible para evitar fotorreactivación.

Cuando la mutación que se trataba de obtener era una reversión de un determinado nutriente (simple caso de necesitar o no necesitar un determinado aminoácido en el medio) u utilización de un determinado azúcar como fuente de carbono, se sembró directamente después del tratamiento en medio mínimo sin el nutriente o con el azúcar cuya utilización se quería demostrar.

4. TRATAMIENTO CON SULFONATO ETILMETILICO

Un cultivo exponencial de aproximadamente 10^8 células por ml se centrifugaba y resuspendía en 9,5 ml de tampón fosfato (tampón del medio M9, pH = 7,1) durante 10 a 20 minutos, con una concentración final del EMS 0,1M. Es necesario usar tampón fosfato ya que el reactivo se hidroliza para dar ácido metanosulfónico (Loveless and Howarth, 1959). Se probó también solución 0,3M, pero aparte de que está en el límite de la solubilidad, las células se morían rápidamente. El tratamiento se hizo a 37° y con agitación. Para construir la curva de mutantes según el tiempo de tratamiento (Figura 4-1) se tomaron muestras cada 5 minutos, se centrifugó y lavó cada una dos veces y se sembraron en medio mínimo sólido para recuento de mutantes.

5. OBTENCION DE MUTANTES

A) Selección de mutantes por el método de la penicilina.

Para obtener mutantes con algún requerimiento auxotrófico nuevo, se cultivó la estirpe en la cual queríamos introducir dicho requerimiento en exceso del mismo durante 5 o 6 generaciones (para que los enzimas necesarios se repriman). A continuación se mutagenizó con nitrosoguanidina en las condiciones usuales y se recreció otra vez durante 5 o 6 generaciones en presencia del aminoácido para que los mutantes así obtenidos pudieran multiplicarse y no llevasen enzimas provenientes de sus progenitores. (es conveniente diluir y repetir este paso). Se lavó y se centrifugó 2 o 3 veces.

Se trató con penicilina (1,000 uu de benzilpenicilato potasico/ml) en medio mínimo y en ausencia del requerimiento que queríamos obtener, teniendo cuidado de empezar con una concentración muy baja de células/ml (10^7 células por ml o menor). En estas condiciones las bacterias que no requieren el aminoácido para vivir, crecen, pero no pueden formar pared celular a causa de la presencia de penicilina por lo que mueren debido a cualquier variación de la presión osmótica. Como al morir echan al medio el requerimiento que pueden tomar las células mutantes, se hace un tratamiento previo durante 20 minutos, se

centrifuga y se vuelven a tratar del mismo modo durante 3 o 4 horas. De esta forma se enriquece el número de mutantes en el medio. Las bacterias supervivientes se siembran en cajas de Petri con medio mínimo más el requerimiento y luego se replican a medio sin el mismo, donde no deberían crecer.

De los mutantes obtenidos se seleccionan las que tienen una mayor frecuencia de reversión con un número de mutantes espontaneos mínimo.

B) Obtención de mutantes.

Los mutantes que usamos en nuestros experimentos con algún requerimiento especial, se obtuvieron bien por el método anteriormente descrito de mutagenesis y selección con penicilina, o bien mutagenizando con nitrosoguanidina y sembrando directamente sobre placas con un medio sólido adecuado. Los mutantes resistentes a la azida de sodio se obtuvieron sembrando directamente sobre placas que contenían un medio nutritivo más el inhibidor y los mutantes que no requerían un determinado aminoácido para vivir después de la mutagenesis, sembrando en placas sin dicho aminoácido pero con todos los demás requerimientos.

Sembrando suficiente cantidad de un cultivo (varios millones de células en una caja de Petri, se puede obtener mutantes espontaneos para un gen determinado. De esta forma obtuvimos el mutante SE37 que deriva de dnaE486 por pérdida de la termosensibilidad para el enzima pol III.

El número de colonias crecidas en cada caja sin un determinado aminoácido se multiplicó por el factor de dilución. Esta cifra de colonias mutantes si se divide por el número total de colonias vivas nos da la frecuencia de mutantes por millón.

6. REVERSION DE MUTACIONES

Para observar la acción mutagénica de la nitrosoguanidina se empleó frecuentemente la frecuencia de reversión de un determinado mutante a tener el fenotipo de la estirpe original. En nuestros experimentos hemos utilizado la reversión de una estirpe leu^- a no necesitar leucina y la capacidad de otra estirpe mutante ara^- a poder utilizar arabinosa como fuente de carbono. Estas reversiones de una mutación anterior son de frecuencia alta y no requiere recrecimiento entre la mutagenesis y la siembra en medio mínimo, ya que aunque una bacteria E. coli creciendo en medio mínimo puede tener de 2 a 4 cromosomas, basta que se produzca una mutación en 1 solo cromosoma permitiendo fabricar el enzima necesario para la síntesis de tal requerimiento, para que la bacteria pueda vivir replicarse y formar una colonia normal. Es necesario sin embargo preparar cuidadosamente el medio para que no haya el más ligero residuo del requerimiento a estudiar, del cultivo del cual provienen las colonias.

La frecuencia de revertientes se averigua tomando una muestra del cultivo ya mutagenizado, lavando dos veces en tampón, diluyendo hasta una concentración adecuada de 200 colonias por placa

(cuando no se sabe cual va a ser la frecuencia de reversión aproximada, se deben tomar al menos 3 diluciones diferentes) y sembrando en medio mínimo sin el requerimiento.

El número de colonias revertientes en cada placa, multiplicado por el factor de dilución nos dará el número de mutantes revertientes por ml que dividido por el número total de células (también por ml) nos da la frecuencia de reversión del mutante. Se suele expresar en número de revertientes por millón de células vivas.

7. AISLAMIENTO DE AUXOTROFOS

Los mutantes derivados de E. coli que son capaces de vivir en medio rico o nutritivo pero no son viables en medio mínimo (sales inorgánicas y una fuente de carbono) se llaman auxotrofos. Generalmente son organismos que han perdido la capacidad de fabricar un nutriente necesario para vivir por falta del enzima correspondiente que lo fabrica que suele ser un aminoácido, vitamina o una base púrica o pirimidínica.

En un cultivo formado a partir de una sola célula E. coli prototrofa (puede vivir unicamente con sales inorgánicas y una fuente de carbono)

existe normalmente 1 por ciento de auxotrofos que requieren una de las tres cosas anteriores, pero si mutagenizamos la proporción aumenta hasta 10 por ciento con un agente poderoso como la nitrosoguanidina. Entonces resulta un índice excelente para medir la mutagenicidad de otros agentes como el sulfonato etilmetílico o la luz ultravioleta.

Cuando se desea determinar el nuevo requerimiento nutritivo presentado por un mutante, el cultivo mutagenizado se siembra en cajas de medio de Luria y las colonias resultantes se trasplantan con palillos de dientes estériles, a cajas con medio mínimo. Las colonias que crecen en el medio nutritivo pero no en el mínimo son, por definición, auxotrofos. Ahora para saber que requerimiento específico precisa se prueba en diferentes medios mínimos suplementados con los requerimientos que se detallan en la Tabla 7.1 . Si un auxótrofo es capaz de vivir en dos de estos medios es porque requiere el producto que aparece en ambos.

Cada uno de los 10 medios contiene el medio mínimo más los suplementos indicados en la fila o columna correspondiente de la Tabla 7.1. Las vitaminas comprenden biotina, ácido fólico, ácido pantotémico, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido paraaminobenzoico, en la cantida prescrita para

el medio de Eagle. Las bases se usaron a 10 $\mu\text{g/ml}$ los aminoácidos a 40 $\mu\text{g/ml}$, el acetato sódico a 40 $\mu\text{g/ml}$ y el inositol a 1 $\mu\text{g/ml}$.

8. SINCRONIZACION EN ESCHERICHIA COLI

El cultivo de E. coli, creciendo en fase exponencial se somete a 90 minutos de hambre de aminoácidos pero conservando en el medio la glucosa y los demás requerimientos (timina y uracilo). En estas condiciones las células llegan a completar el círculo de ADN que estaba ya comenzado, pero no son capaces de iniciar uno nuevo (Maaløe y Hanawalt, 1961; Lark et al., 1963). Las células así tratadas tienen sus cromosomas completos y si entonces se les priva de timina, pero en presencia de aminoácidos y uracilo pueden sintetizar los enzimas necesarios para iniciar la replicación, pero no empezar un nuevo ciclo por ausencia de timina. Un período de 50 minutos con aminoácidos es suficiente para formar la síntesis de proteínas necesarias para iniciar la síntesis de un círculo nuevo de ADN.

Inmediatamente después de añadir la timina las células empiezan una replicación sincronizada de sus cromosomas.

TABLA 7.1. Medios para determinar los requerimientos nutritivos de los auxótrofos.

	6	7	8	9	10
1	ade	phe	ala	arg	leu
2	hyp	ser	cys	inos	gly
3	ura	thy	thr	asp	ile+val
4	gua	tyr	acet	pro	his
5	thy	vitam	met	glu	lys

Cada uno de los 10 medios contiene el medio mínimo más los suplementos indicados en la fila o columna correspondiente de la tabla. Las vitaminas comprenden biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido paraaminobenzoico, en la cantidad prescrita para el medio de Eagle. Las bases se usan a 10 µg/ml, los aminoácidos a 40 µg/ml, el acetato sódico a 40 µg/ml y el inositol a 1 µg/ml.

BIBLIOGRAFIA

ABE, M. y TOMIZAWA, J.I. (1967). Proc. Nat. Acad. Sci.
U.S.A., 58: 1911.

ABE, M. y TOMIZAWA, J.I. (1971). Genetics, 69: 1.

ADELBERG, E.A., MANDEL, M. y CHEIN-CHING-CHEN, G. (1965).
Biochem. Biophys. Res. Commun., 18: 788.

ANDERSON, T. y BURDON, R. (1970). Cancer Res., 30:
1773-1781.

BIRD, R.E., LOUARN, J., MARTUSCELLI, J. y CARO, J. (1972).
J. Mol. Biol., 70: 549.

BRUTLAG, D., ATKINSON, M.R., SETLOW, P. y KORNBERG, A.
(1969). Biochem. Biophys. Res. Commun., 37: 982.

CAIRNS, J. (1963). J. Mol. Biol., 6: 208.

CALENDAR, R., LINDQUIST, B., SIRONI, G. y CLARK, A.J.
(1970). Virology, 40: 72.

CAMPBELL, J.L., SOLL, L. y RICHARDSON, C.C. (1972).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69: 2090-2094.

CARO, L.G. y BERG, C.M. (1968). Cold Spr. Harb. Symp.

Quant. Biol., 33: 559.

CARO, L.G. y BERG, C.M. (1969). J. Mol. Biol., 45: 325.

CERDA OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1967). Biochim. Biophys.

Acta, 142: 450.

CERDA OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1968). Mol. Gen. Genet.,

101: 191-202.

CERDA OLMEDO, E., HANAWALT, P.C. y GUEROLA, N. (1968).

J. Mol. Biol., 33: 705.

CHANDRA, P. WACKER, A., SUSSMUTH, R. y LINGENS, F. (1967).

Z. Naturforsch., 22b: 512-517.

COPELAND, J.C. (1969). J. Bacteriol., 99: 730.

CRADDOCK, V.M. (1969). Biochem. J., 111: 615.

DAWES, I.W. y CARTER, B.L.A. (1974). Nature, 250: 709.

DE LUCIA, P. y CAIRNS, J. (1969). Nature, 224: 1164.

DEMEREK, M., ADELBERG, E.A., CLARK, A.J. y

HARTMAN, P.E. (1966). Genetics, 54: 61.

DRUCKREY, H. PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S., SO, B.T.,

SCHMIDT, C.H. y BUCHELER, J. (1966). Z. Krebs-
forsch., 68: 87-102.

DUGLE, D.L., CAMPBELL, C.E., MEEKER, B.E. y GILLESPIE,

C.J. (1973). Mut. Res., 18: 237-245.

EISENSTARK, A., EISENSTARK, R. y VAN SICKLE, R. (1965).

Mut. Res., 2: 1.

FREESE, E. y BAUTZ-FREESE, E. (1966). Radiation Res.,

Suppl., 6: 97.

GEFTER, M.L., HIROTA, Y., KORNBERG, T., WECHSLER, J.A. y

BARNOUX, C. (1971). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.,
68: 3150-3153.

GICHNER, T. y VELEMINSKY, J. (1967). Mut. Res., 4: 207-212.

GOLDIN, A., VENDITTI, J.M. y KLINE, I. (1959). Cancer Res.,

19: 429.

GOMORI, G. (1955). *Methods in Enzimology*, Acad. Press, N.Y., 1: 138.

GREEN, D.M. y COLARUSSO, L.J. (1964). *Biochim. Biophys. Acta*, 89: 277.

GREENBERG, J. (1965). *Mut. Res.*, 2: 304.

GROSS, J.D. y GROSS, M. (1969). *Nature*, 224: 1166.

GRUNBERG-MANAGO, M. y OCHOA, S. (1955). *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 3165.

GUEROLA, N., INGRAHAM, J.L. y CERDA OLMEDO, E. (1971). *Nature New Biol.*, 230: 122.

HAERLIN, R., SUSSMUTH, R. y LINGENS, F. (1970). *FEBS Letters*, 9: 175.

HARTMAN, P.E., HARTMAN, Z., STAHL, R.C. y AMES, B.N. (1971). *Adv. in Genetics.*, 6: 1.

HALL, R.M. y BRAMMAR, W.J. (1973). *Mol. Gen. Genet.*, 121: 271-276.

HELMSTETTER, C.E. (1968). J. Bact., 95: 1634.

HENRY, R.A. (1950a). J. Am. Chem. Soc., 72: 3287.

HIROTA, Y., MORDOM, J. y JACOB, F. (1970). J. Mol. Biol.,
53: 369.

HOHLFELD, R. (1973). Comunicación personal.

HOHLFELD, R. y VIELMETTER, W. (1973). Nature, 242: 118.

ISONO, S. y YOURNO, J. (1974). J. Mol. Biol., 82: 355.

JIMENEZ SANCHEZ, A. (1974). Tesis Doctoral. Universidad de
Sevilla.

JYSSUM, K. (1969). J. Bacteriol., 99: 757.

KIMBALL, R.F. (1970). Mut. Res., 9: 261-271.

KIMBALL, R.F. y SETLOW, J.K. (1974). Mut. Res., 22: 1-14.

KLENOW, H. y HENNINGSEN, I. (1970). Proc. Nat. Acad. Sci.
U.S.A., 65: 168.

KONDO, S. y ICHIKAWA, H. (1973). Mol. Gen. Genet., 126:
319.

KONRAD, E.B. y LEHMAN, I.R. (1974). Proc. Nat. Acad. Sci.
U.S.A., 71: 2048.

KOSHINUMA, K., IWAHARA, S., KAMIYA, S., NAKADATE, M. y
SUZUKI, I. (1970). Bull. Nat. Inst. Hyg. Sci.,
Tokyo, 88: 118-123.

LARK, K.G., REPKO, T. y HOFFMAN, E.J. (1963). Biochim.
Biophys. Acta, 76: 9-24.

LAWLEY, P.D. (1968). Nature, 218: 580.

LAWLEY, P.D. y THATCHER, C.J. (1970). Biochem. J., 116:
693-707.

LEHMAN, I.R. y CHIEN, J.R. (1973). J. Biol. Chem., 22:
7717-7723.

LINGENS, F., HAERLIN, R. y SUSSMUTH, R.C. (1971). FEBS
Letters, 13: 241.

LINGENS, F. y OLTMANN, O. (1966). Naturforsch., 21:
660-663.

LLOVERES, C. (1974). Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

LLOVERES, C. y CERDA OLMEDO, E. (1973). J. Bact., 116: 527.

LOVELESS, A. (1969). Nature, 223: 206-207.

LOVELESS, A. y HOWARTH, S. (1959). Nature, 184: 1780.

MAALØE, O. y HANAWALT, P.C. (1961). J. Mol. Biol., 3: 144.

MALKE, H. (1968). Mol. Gen. Genet., 102: 241.

MANDELL, J.D. y GREENBERG, J. (1960). Biochem. Biophys. Res. Commun., 3: 575-577.

MALLING, H.V. y DE SERRES, F.J. (1970). Molec. Gen. Genet., 106: 195.

MASTERS, M. y BRODA, P. (1971). Nature New Biol., 232: 137.

MESELSON, M. y STAHL, F. (1958). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 44: 671.

MC CALLA, D.R. (1968). *Biochim. Biophys. Acta*, 155:
114-120.

MC CALLA, D.R., REUVERS, A. y KITAI, R. (1968). *Can. J. Biochem. Physiol.*, 46: 807-811.

MC KAY, A.F. (1948). *J. Am. Chem. Soc.*, 70: 1974-1975.

MC KAY, A.F. (1949). *J. Am. Chem. Soc.*, 71: 1968-1970.

MC KAY, A.F. (1952). *Chem. Rev.*, 51: 301.

MC KAY, A.F., OTT, W.L., TAYLOR, G.W., BUCHANAN, M.N. y
CROOKER, J.F. (1950). *Can. J. Res.*, 28: 683.

MC KAY, A.F. y WRIGHT, G.F. (1947). *J. Am. Chem. Soc.*,
69: 3028-3030.

NAGAO, M., YOKOSHIMA, T., HOSOI, H. y SUGIMURA, T. (1969).
Biochim. Biophys. Acta, 192: 191-199.

OESCHGER, N.S. y HARTMAN, P.E. (1970). *J. Bact.*, 101:
490.

- OKAZAKI, R., SUGIMOTO, K., OKAZAKI, T., IMAE, Y. y
SUGINO, A. (1970). Nature, 228: 223.
- OLIVERA, B.M. y BONHOEFFER, F. (1974). Nature, 250:
513.
- OTTO, B., BONHOEFFER, F. y SCHALLER, H. (1972). Eur. J.
Biochem., 34: 440-447.
- OVERBERGER, C.G., ANSELME, J.P. y LOMBARDINO, J.G. (1966).
New York.
- LA POLLA, J.P., HARRIS, C.M. y VARY, J.C. (1972). Biochem.
Biophys. Res. Commun., 49: 133-138.
- RANDAZZO, R., SERMONTI, G., CARERE, A. y BIGNAMI, M. (1973).
J. Bact., 113: 500.
- RIDDLE, D.L. y ROTH, J.R. (1970). J. Mol. Biol., 54: 131.
- RYAN, F. y CETRULLO, S. (1963). Biochem. Biophys. Res.
Commun., 12: 445.

SCHOENTAL, R. (1966). *Nature*, 209: 726-727.

SCHWAIER, R. (1956). *Z. Vererbungsl.*, 97: 55.

SINGER, B., FRAENKEL-CONRAT, H., GREENBERG, J. y

MICHELSON, A.M. (1968). *Science*, 160: 1235-1237.

SINGER, B. y FRAENKEL-CONRAT, H. (1969a). *Biochemistry*,

8: 3260-3266.

SINGER, B. y FRAENKEL-CONRAT, H. (1969b). *Biochemistry*,

8: 3266-3269.

SKINNER, W.A., GRAM, H.F., GREENE, M.O., GREENBERG, J.

y BAKER, B.R. (1960). *J. Med. Pharm. Chem.*, 2: 299.

SPEYER, J.F. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 21: 6.

SUGIMURA, T., NAGAO, M. y OKADA, Y. (1966). *Nature*, 210:

962-963.

SUGIMURA, T., FUJIMURA, S., NAGAO, M., YOKOSHIMA, T. y

HASEGAWA, M. (1968). *Biochim. Biophys. Acta*, 170:

427-429.

SUSSMUTH, R. y LINGENS, F. (1969). Z. Naturforsch., 24b:
903-910.

TAYLOR, A.L. y TROTTER, C.D. (1972). Bact. Rev., 36: 504.

TERAWAKI, A. y GREENBERG, J. (1965). Biochim. Biophys.
Acta, 95: 170-173.

TORRES, S. (1974). Tesis de Licenciatura. Universidad
de Sevilla.

WARD, C.B. y GLASER, D.A. (1969). Proc. Nat. Acad. Sci.
U.S.A., 62: 881.

WECHSLER, J.A. y GROSS, J.D. (1971). Mol. Gen. Genet.,
113: 273.

WOLF, B., NEWMAN, A. y GLASER, D.A. (1968). J. Mol. Biol.,
32: 611-629.

WHITFIELD, H.J., MARTIN, R.G. y AMES, B.N. (1966).
J. Mol. Biol., 21: 335.

WICKNER, W., SCHEKMAN, R., GEIDER, K. y KORNBERG, A.
(1973). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 70: 1764-1767.

YOSHIDA, Y. y YUKI, S. (1968). Japan J. Genet., 43:
173.

ZOLLINGER, H. (1961). London.

177

FACULTAD DE CIENCIAS

Constituido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
a el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

M^o NATALIA GUEROLA CARPI
titulada MECANISMOS DE ACCION DE LA NITROSQUANIDINA
SOBRE EL CROMOSOMA DE ESCHERICHIA COLI

Concedió otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE,

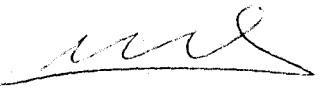
"cum laude"

Sevilla, 19 de Noviembre 1974

El Vocal,

El Vocal,

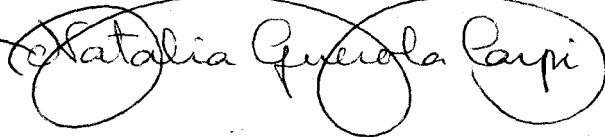
El Vocal,



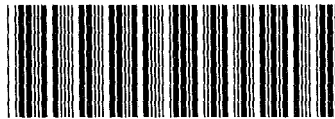
El Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672246