

21-12-78

102

TR
677

TD
677

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA ESTIRPE
DE *Escherichia coli* INMUTABLE POR NITROSOGUA-
NIDINA

R. 4031

Trabajo realizado en el Departamento de Genética,
Facultad de Ciencias, Universidad de Sevilla,
para optar al grado de Doctor en Ciencias, por
la Licenciada

ROSA MARIA RUIZ VAZQUEZ

Rosa María Ruiz Vazquez

Sevilla, Diciembre de 1978

Director y Ponente

R. Cerdá Olmedo

Profesor Enrique Cerdá Olmedo
Director del Departamento de Genética

RESUMEN

En esta tesis se ha abordado el estudio del mecanismo de acción de la nitrosoguanidina mediante el aislamiento y posterior caracterización de una estirpe inmutable por nitrosoguanidina. Se concluye que:

1. En la mutagénesis por nitrosoguanidina interviene una función celular determinada por el gen *inm*, identificado en esta tesis siguiendo un procedimiento original, y localizado en el minuto 79,5 del mapa genético de *E. coli*. Las estirpes que llevan una mutación en el gen *inm* son muy escasamente mutables por la nitrosoguanidina.

2. La función celular determinada por el gen *inm* es específica para la acción mutagénica de la nitrosoguanidina y no interviene en la inducción de daños letales.

3. La mutación *inm* no afecta a la mutagénesis espontánea, ni por metanosulfonato de etilo, ni por ultravioleta, ni al sistema de reparación especial inducido por agentes alquilantes.

4. El ADN de células tratadas con nitrosoguanidina se aísla en fragmentos de menor peso molecular que el ADN de células no tratadas.

5. La actividad reparadora inducida por nitrosoguanidina no actúa sobre la mayoría de las metilaciones, sino sobre otro tipo de daño .

6. Proponemos que el gen *inm* determina un componente, hasta ahora desconocido, de la maquinaria de replicación. La nitrosoguanidina induce mutaciones en la zona en replicación por actuar sobre el producto normal del gen *inm*, $p(inm)$, el cual causa numerosos errores cuando se reanuda la replicación tras la acción de la nitrosoguanidina. Estos errores son reparados por varios sistemas de reparación distintos, incluyendo el sistema de reparación de

emergencia dependiente de *recA* y *lexA*, notorio por su escasa fidelidad. Las mutaciones se deben a errores no corregidos o a errores defectuosamente corregidos por el sistema de reparación de emergencia.

INDICE DE MATERIAS

RESUMEN.....	2
INDICE DE MATERIAS.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	8
INDICE DE TABLAS.....	10

INTRODUCCION

1. Estabilidad de la nitrosoguanidina.....	12
2. Reacciones de la nitrosoguanidina.....	13
3. Tipo de mutaciones causadas por la nitroso- guanidina.....	15
4. Mutagénesis por nitrosoguanidina.....	16
5. Saturación y reparación.....	19
6. Mecanismo de mutación.....	24

MATERIALES

1. Estirpes bacterianas.....	32
2. Fagos.....	33
3. Productos químicos.....	33
4. Tampones.....	34
5. Medios líquidos.....	35
6. Medios sólidos.....	36

METODOS

1. Crecimiento.....	38
2. Enumeración de bacterias vivas.....	38
3. Tratamiento con nitrosoguanidina.....	38
4. Tratamiento con metanosulfonato de etilo.....	39
5. Tratamiento con luz ultravioleta.....	39
6. Tratamiento con ultrasonidos.....	40
7. Ensayo simplificado de sensibilidad a la luz ultravioleta.....	40
8. Aislamiento de revertientes resistentes a la luz ultravioleta.....	41

- 9. Aislamiento de estirpes sensibles a la arabinosa..... 41
- 10. Aislamiento de mutantes espontáneos resistentes a la estreptomycin..... 42
- 11. Conjugación interrumpida..... 43
- 12. Obtención de lisados del fago P1..... 43
- 13. Titulación del fago P1..... 44
- 14. Transducción con el fago P1..... 44
- 15. Aislamiento de ADN de E. coli..... 45
- 16. Aislamiento de ADN del fago P22..... 45
- 17. Centrifugación de ADN en gradiente de sacarosa..... 45
- 18. Incorporación de radioactividad en ADN de células tratadas con (¹⁴C-metil)-nitro-nitrosoguanidina..... 45

RESULTADOS

I. SISTEMA DE DETECCION

- 1. Obtención de una estirpe sensible a la arabinosa..... 49
- 2. Caracterización de la estirpe sensible a la arabinosa..... 51
- 3. Mutaciones que confieren resistencia a la arabinosa..... 55

II. AISLAMIENTO DE ESTIRPES INMUTABLES POR NITROSOGUANIDINA

- 1. Aislamiento de posibles estirpes inmutables.... 57
- 2. Caracterización de las estirpes obtenidas..... 57

III. FENOTIPO DE LA ESTIRPE SE43

- 1. Influencia de la letalidad en la frecuencia de mutación..... 65
- 2. Letalidad y mutagénesis inducidas por metanosulfonato de etilo..... 65

3. Letalidad y frecuencia de auxótrofos inducidos por luz ultravioleta.....	67
4. Frecuencia de mutantes Ara ^R inducidos por luz ultravioleta.....	70
5. Pautas de crecimiento de SE43.....	71
IV. LOCALIZACION DE LA MUTACION <i>inm</i> POR CONJUGACION	
1. Comprobación de la capacidad donante de SE43.....	74
2. Localización de la mutación <i>inm</i>	74
3. Dos mutaciones distintas en la estirpe SE43.....	77
4. Obtención de revertientes resistentes a la ultravioleta en SE43.....	78
V. ESTUDIO DE LAS DOS MUTACIONES DE SE43	
1. Sensibilidad a nitrosoguanidina y crecimiento....	79
2. Letalidad y mutagénesis inducidas por luz ultravioleta.....	80
3. Letalidad y mutagénesis inducidas por nitrosoguanidina.....	83
4. SE43 lleva una mutación <i>recA</i>	83
VI. ESTUDIO DE LA MUTACION <i>inm</i>	
1. Frecuencia de mutación espontánea.....	85
2. Respuesta adaptativa de SE53 a la nitrosoguanidina.....	85
3. SE53 no es un mutante <i>dam</i>	87
4. Localización de la mutación <i>inm</i> por transducción.....	88
VII. EFECTO DE LA NITROSOGUANIDINA SOBRE EL ADN DE <i>E. coli</i>	
1. Disociación del ADN.....	91
2. Tamaño del ADN según centrifugación en gradiente de sacarosa.....	91
3. Reparación de las metilaciones en el ADN inducidas por nitrosoguanidina.....	95

DISCUSION

1. Sistema de detección de estirpes inmutables por nitrosoguanidina.....	98
2. Características de las estirpes inm.....	100
3. Efecto de la nitrosoguanidina sobre el ADN de <i>E. coli</i>	104
4. Mecanismo de acción de la nitrosoguanidina.....	105
BIBLIOGRAFIA.....	111
AGRADECIMIENTOS.....	122

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Mapa genético de *E. coli*, indicando la posición de los marcadores mencionados en esta tesis. Ruta catabólica de la arabinosa..... 28

Fig. 2.- Cinética de transferencia de los caracteres Thr⁺, Ilv⁺, e His⁺ en una conjugación interrumpida entre las estirpes SE101 y AT3055..... 52

Fig. 3.- Cinética de transferencia de los caracteres Ara⁺ y Thr⁺ en una conjugación interrumpida entre las estirpes SE13 y SE47... 54

Fig. 4.- Observación del crecimiento en cajas con arabinosa, glicerina y nitrosoguanidina de la estirpe original y de una posible estirpe inmutable..... 58

Fig. 5.- Pautas de crecimiento de la estirpe original SE101 y de siete posibles estirpes inmutables..... 62

Fig. 6.- Viabilidad y frecuencias de mutantes Ara^R en cultivos de SE101 y SE43 expuestos a ultrasonidos..... 66

Fig. 7.- Viabilidad y frecuencias de mutantes Ara^R en cultivos de SE101 y SE43 expuestos a metanosulfonato de etilo..... 68

Fig. 8.- Viabilidad de las estirpes SE101 y SE43 expuestas a irradiación ultravioleta..... 69

Fig. 9.- Frecuencia de mutantes Ara^R entre los supervivientes al tratamiento con luz ultravioleta en las estirpes SE101 y SE43... 72

Fig. 10.- Cinética de transferencia de los caracteres Thr ⁺ e His ⁺ en una conjugación interrumpida entre las estirpes SE43 y AT3055.....	75
Fig. 11.- Localización de la mutación <i>inm</i> por conjugación interrumpida entre las estirpes SE43 y SE47.....	76
Fig. 12.- Viabilidad de las estirpes SE47 y SE53 expuestas a irradiación ultravioleta.....	81
Fig. 13.- Frecuencia de mutantes Ara ^R entre los supervivientes al tratamiento con luz ultravioleta en las estirpes SE47 y SE53..	82
Fig. 14.- Viabilidad y frecuencias de mutante Ara ^R en cultivos de SE47 y SE53 expuestos a nitrosoguanidina.....	84
Fig. 15.- Respuesta adaptativa de SE53 a la nitrosoguanidina.....	86
Fig. 16.- Localización de la mutación <i>inm</i> por transducción.....	90
Fig. 17.- Efecto de la nitrosoguanidina sobre la disociación del ADN en función de la temperatura.....	92
Fig. 18.- Efecto de la nitrosoguanidina sobre el tamaño del ADN según centrifugación en gradiente de sacarosa.....	94

INDICE DE TABLAS

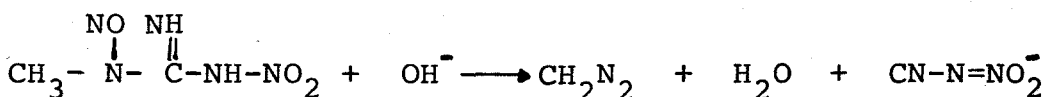
Tabla I.- Frecuencias de mutantes Ara ^R inducidos por nitrosoguanidina en cinco estirpes Ara ^S	50
Tabla II.- Frecuencia de mutantes inducidos por nitrosoguanidina en estirpes preseleccionadas como posiblemente inmutables.....	60
Tabla III.- Tiempo de generación de la estirpe SE101 y de las ocho estirpes preseleccionadas como inmutables.....	61
Tabla IV.- Viabilidad y sensibilidad a nitrosoguanidina de las estirpes preseleccionadas como inmutables.....	63
Tabla V.- Frecuencias de auxótrofos inducidos en SE101 y SE43 por irradiación ultravioleta.....	70
Tabla VI.- Tiempo de generación y viabilidad de las estirpes SE101 y SE43.....	73
Tabla VII.- Mutabilidad por nitrosoguanidina de los recombinantes Ilv ⁺ Str ^R	77
Tabla VIII.- Letalidad y frecuencias de auxótrofos inducidos por nitrosoguanidina en recombinantes Ilv ⁺ Str ^R inmutables.....	80
Tabla IX.- Frecuencias de mutación espontánea en las estirpes <i>inm</i> y en sus parentales.....	87
Tabla X.- Radioactividad incorporada en ADN de células tratadas con (¹⁴ C-metil)-nitrosoguanidina.....	96

INTRODUCCION

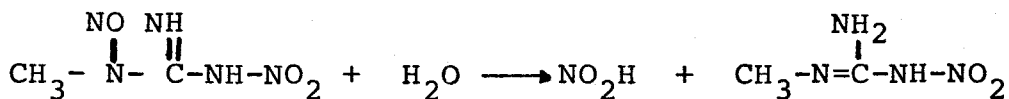
La N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina) es conocida por los químicos desde hace una treintena de años (McKay y Wright, 1947). Desde el descubrimiento de sus propiedades mutagénicas (Mandell y Greenberg, 1960), se ha empleado rutinariamente en la búsqueda de mutantes en laboratorio, debido a su capacidad para inducir mutaciones con alta frecuencia sin causar una letalidad elevada (Adelberg *et al.*, 1965; Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968; Yoshida y Yuki, 1968). Neale (1976) ha revisado recientemente la extensa literatura sobre este compuesto y otros relacionados.

1. Estabilidad de la nitrosoguanidina

La nitrosoguanidina en solución es muy inestable, aumentando la inestabilidad con el pH y dando lugar al gas diazometano (McKay, 1948).



En condiciones ácidas (Mandell y Greenberg, 1960), o por acción del calor (La Polla *et al.*, 1972) o la luz (McCalla *et al.*, 1968), se descompone en ácido nitroso y N-metil-N'-nitroguanidina.



La descomposición de la nitrosoguanidina puede medirse por la desaparición de la absorción de luz a 400 nm (Lawley y Thatcher, 1970), que refleja la

pérdida del grupo nitroso. La estabilidad es máxima a pH 5.

2. Reacciones de la nitrosoguanidina

La nitrosoguanidina reacciona con muchos compuestos químicos, metilándolos o transfiriéndoles el grupo nitroguanido. Este último es el caso de las aminas primarias (McKay, 1949) y de los tioles (Lawley y Thatcher, 1970). En las proteínas el grupo amino de la lisina constituye el blanco preferente de esta reacción (Sugimura *et al.*, 1968; McCalla y Reuvers, 1968). Las proteínas también pueden ser metiladas, pero con una eficacia unas diez veces menor (Nagao *et al.*, 1969).

La metilación del ADN por la nitrosoguanidina ha sido objeto de muchas investigaciones. La nitrosoguanidina es un agente alquilante monofuncional del tipo S_N1 , caracterizado por una alta reactividad con los átomos de oxígeno del ADN. Esto la diferencia de los agentes alquilantes del tipo S_N2 , como el metanosulfonato de metilo y el dimetilsulfato, que reaccionan sobre todo con los nitrógenos del ADN (Lawley, 1975).

Como producto de la metilación del ADN por la nitrosoguanidina, se han aislado derivados metilados de todas las bases, excepto de la timina. El producto cuantitativamente más importante es la N^7 -metilguanina, que supone el 67% de la metilación total (Strauss *et al.*, 1975). Quizás por eso se pensó que este derivado era el causante de la alta actividad mutagénica

de la nitrosoguanidina. Sin embargo, mediante estudios *in vitro* con polinucleótidos alquilados sintéticos, se ha demostrado que la N⁷-metilguanina no induce apareamientos erróneos (Singer, 1975). Otro producto de alquilación, la O⁶-metilguanina es el mejor candidato para la inducción de apareamientos erróneos (Loveless, 1969; Lawley *et al.*, 1973; Singer, 1975). Se ha sugerido que la actividad mutagénica de los agentes alquilantes depende de la formación de O⁶-metilguanina. La guanina metilada en el oxígeno seis puede aparearse con timina, induciendo por tanto sustituciones GC → AT (Prakash y Sherman, 1973; Lawley, 1974).

Durante un tiempo se ha creído que el diazometano, producto de descomposición de la nitrosoguanidina, era en realidad el agente metilante ya que en condiciones de mayor descomposición se encuentran más metilaciones (McCalla, 1968; Craddock, 1969). Sin embargo, al tratar ADN, *in vitro* o *in vivo*, con nitrosoguanidina marcada con tres átomos de deuterio en su grupo metilo, se encontró N⁷-metilguanina con tres deuterios en el grupo metilo (Haerlin *et al.*, 1970; Lingens *et al.*, 1971). El diazometano no pudo servir de intermediario porque sólo tiene dos hidrógenos. Ahora se piensa que el agente alquilante es el ión metil-diazonio o el ión carbonio derivado de él. Posteriormente se ha demostrado que distintas condiciones de descomposición no se correlacionan con distintas frecuencias de mutantes (Hince y Neale, 1974).

La metilación de las purinas acarrea su separación del ADN, sobre todo en el caso de metilaciones en N³ (Orgel, 1965; Strauss *et al.*, 1975). La velo-

cidad, relativamente alta, de pérdida de las purinas metiladas no se puede explicar sólo por hidrólisis espontánea y se ha sugerido (Strauss *et al.*, 1975) que también actuaría la endonucleasa II (Kirtikar y Goldthwait, 1974), que produciría incisiones en el ADN. El ADN de células tratadas con nitrosoguanidina presenta abundantes incisiones uncatenarias, que pueden ser la causa de la letalidad (Olson y Baird, 1969; Dugle *et al.*, 1973). Dugle y colaboradores encontraron una estrecha relación entre el número de incisiones producidas en el ADN, la concentración de nitrosoguanidina y la supervivencia. También demostraron que estas incisiones estaban repartidas por todo el cromosoma de forma aleatoria.

3. Tipo de mutaciones causadas por la nitrosoguanidina

Las mutaciones causadas por la nitrosoguanidina son casi siempre revertibles por ella y por mutágenos que cambian una base por otra, sugiriendo que la nitrosoguanidina actúa principalmente causando sustituciones de bases (Eisenstark *et al.*, 1965; Whitfield *et al.*, 1966). Un alto porcentaje de las mutaciones puntuales inducidas por nitrosoguanidina son terminaciones prematuras (Langridge y Campbell, 1969; Coulondre y Miller, 1977).

Coulondre y Miller (1977), estudiando la inducción de mutantes ámbar y ocre en el gen *lacI* de *Escherichia coli* y su reversión por varios mutágenos, han demostrado que la nitrosoguanidina induce eficazmente sustituciones GC → AT y, menos eficazmente, AT → GC. Esto ocurre tanto en la inducción de los mutantes

ámbar u ocre como en su reversión. Los cambios GC → TA, AT → TA, AT → CG y GC → CG no se encuentran nunca en mutantes inducidos por nitrosoguanidina. El agente alquilante metanosulfonato de etilo muestra una especificidad mutagénica muy parecida.

La alta especificidad para cambios GC → AT de la nitrosoguanidina y el metanosulfonato de etilo había sido demostrada anteriormente en *Saccharomyces cerevisiae* por Sherman y colaboradores (Prakash y Sherman, 1973) estudiando la reversión de mutantes en el gen del iso-1-citocromo *c*.

La nitrosoguanidina causa ocasionalmente mutaciones por desfase. En *Salmonella typhimurium*, algunas de las mutaciones inducidas por ICR-191, mutágeno que produce preferentemente desfases, son revertibles por nitrosoguanidina (Oeschger y Hartman, 1970). La identificación de los cambios en la secuencia de aminoácidos en un mutante por desfase y sus revertientes inducidos por nitrosoguanidina, demostró que ésta podía causar deleciones de pares GC (Yourno *et al.*, 1969).

4. Mutagénesis por nitrosoguanidina

En un cultivo sincrónico de *E. coli*, la frecuencia máxima de mutaciones inducidas por nitrosoguanidina en un gen se obtiene en el momento en que se replica ese gen (Cerdá Olmedo *et al.*, 1968). Se estima que aproximadamente el 80% de las mutaciones inducidas por nitrosoguanidina en un cultivo exponencial se localizan en la región que se estaba replicando en el momento del tratamiento (Guerola *et al.*, 1971).

La mutagénesis preferencial en la región en replicación ha sido posteriormente confirmada en muchos organismos: *Pseudomonas aeruginosa* (Booker y Loutit, 1975), *Streptomyces lipmanii* (Godfrey, 1974), *Neisseria meningitidis* (Jyssum, 1969), *Mycobacterium phlei* (Koníckova-Radochová y Konicek, 1974, 1976), *Micrococcus glutamicus* (Vikhanskii y Zhdanova, 1976), *Anacystis nidulans* (Asato y Folsonme, 1970), *Chlamydomonas reinhardtii* (Lee y Jones, 1973) y *Saccharomyces cerevisiae* (Burke y Fangman, 1975; Dawes y Carter, 1974).

El orden en que aparecen los máximos de distintos genes concuerda con su situación en el mapa genético permitiendo de esta forma construir un mapa de replicación del organismo en cuestión y estudiar el modo y regulación de la replicación cromosómica (Cerdá Olmedo *et al.*, 1968; Edlund *et al.*, 1976; Hohlfeld y Vielmetter, 1973; Schwartz y Worcel, 1971; Ward y Glaser, 1969a, 1969b, 1970).

La concentración de mutaciones inducidas por la nitrosoguanidina en pequeños fragmentos del ADN que se están replicando, da lugar a la inducción simultánea de mutaciones en genes que están estrechamente ligados (Guerola *et al.*, 1971). Este hecho se conoce como comutación. En *E. coli* la comutación es detectable para genes separados por menos del 1,5% de la longitud total del cromosoma. En un segmento de ADN de 50.000 pares de bases de longitud se producirían un centenar de sustituciones. Como consecuencia, los clones seleccionados con mutaciones en un gen, tienen una probabilidad unas 20 veces mayor de llevar mutaciones en los genes vecinos que los clones no seleccionados. La pérdida de actividad de un producto gé-

nico a niveles que resultarían en auxotrofia en los genes apropiados, puede encontrarse por tanto con una frecuencia de aproximadamente el uno por ciento.

En *Streptomyces coelicolor* se han llevado a cabo estudios detallados de comutación (Randazzo *et al.*, 1976). Los fragmentos sensibles son más largos que en *E. coli* y todas las mutaciones que se producen están situadas en ellos, encontrándose una frecuencia de comutación entre genes contiguos de hasta un 4%. También se ha detectado alta comutación en genes de un plásmido de *E. coli* (Koyama *et al.*, 1975).

La comutación puede afectar a genes distantes que se estén replicando simultáneamente. Esto ha sido demostrado en *E. coli* (Edlund *et al.*, 1976) y *Bacillus subtilis* (Siccardi *et al.*, 1976). En levaduras aún no se ha descrito comutación entre genes ligados, pero hay una comutación específica entre genes distantes correplícantes (Dawes *et al.*, 1977).

La comutación se ha utilizado ampliamente en la búsqueda de mutantes difíciles de conseguir, particularmente aquellos que no pueden ser seleccionados (Degen y Cox, 1974; Vinopal *et al.*, 1975; Hillman y Fraenkel, 1975; Oeschger y Berlyn, 1975; Siegel e Ivers, 1975; Cohn y Crawford, 1976).

La nitrosoguanidina no es el único mutágeno que causa mutaciones en la zona de replicación. Este efecto se ha visto en otros compuestos N-nitroso como la N-nitroso-N-etilurea y la N-nitroso-N-metilurea (Hince y Neale, 1974; Mishankin *et al.*, 1973) y en análogos de bases como la 2-aminopurina (Ryan y Cetrullo, 1963), que se

incorpora en el ADN en vez de la base correspondiente, altera la estructura química de éste y provoca apareamientos erróneos. Algunos autores han encontrado también acción mutagénica preferencial en la zona de replicación con agentes como la hidroxilamina y el formaldehído (Salganik, 1972), presumiblemente debido a su mayor reactividad por ADN uncatenario que por el bicatenario; con luz ultravioleta (Kunicki-Goldfinger y Mycielski, 1966); con luz ultravioleta cercana (Webb y Tai, 1970); con acridinas (Newton *et al.*, 1972) y con metanosulfonato de etilo (Delaney y Carr, 1975). En la mayoría de los casos, la preferencia por el punto de replicación es escasa, y en algunos, no ha sido confirmada por otros experimentadores.

5. Saturación y reparación

Un hecho característico en la mutagénesis por nitrosoguanidina es que la proporción de mutantes entre las células supervivientes alcanza un máximo a los pocos minutos de tratamiento y se satura, aún cuando la letalidad continúe aumentando (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968; Kondo *et al.*, 1970; Jiménez Sánchez y Cerdá Olmedo, 1975). Esta saturación no se explica por la pérdida de actividad de la nitrosoguanidina ya que su descomposición en las condiciones de los tratamientos es mucho más lenta que la saturación (Jiménez Sánchez y Cerdá Olmedo, 1975).

Aprovechando que las células cuyo ADN contiene bromouracilo son sensibles a irradiación con luz de 313 nm, se determinó que las mutaciones por nitrosoguanidina se originan en células que han parado la

replicación (Jiménez Sánchez y Cerdá Olmedo, 1975). En un cultivo de *E. coli* tratado, en presencia de bromouracilo, con 1 µg/ml de nitrosoguanidina y expuesto posteriormente a irradiación con luz de 313 nm, la frecuencia de mutantes obtenidos entre los supervivientes es más alta que en cultivos que no han sido irradiados. Ya que los supervivientes constituyen una pequeña fracción que no han incorporado el bromouracilo, presumiblemente porque han parado su replicación, se puede deducir que la nitrosoguanidina produce las mutaciones precisamente en esa pequeña fracción de células que paran su replicación.

La nitrosoguanidina a dosis bajas (1 µg/ml) no afecta a la replicación global del cultivo de células (Jiménez Sánchez y Cerdá Olmedo, 1975), pero, en concentraciones mayores inhibe drásticamente la replicación, de modo que durante algún tiempo se detecta síntesis reparadora (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967 a y b), pero no replicación normal. Parece, por tanto, que la nitrosoguanidina induce la actividad reparadora en la célula.

Esta actividad reparadora no está distribuida por igual por todo el cromosoma, sino que es más intensa en la zona de replicación. Scudiero y Strauss (1976) lograron separar ADN bicatenario del ADN con puntos de replicación mediante columna de BND-celulosa. Cuando se tratan células de *E. coli* en presencia de hidroxilamina y de isótopos radioactivos con nitrosoguanidina o nitrosourea, aumenta la reparación preferentemente en el ADN con puntos de replicación, en tanto que el metanosulfonato de metilo, acetoxiacetilamino-fluoreno y bromometilbenzoantraceno inducen una repa-

ración por igual en todo el ADN. El tratamiento *in vitro* de ADN con nitrosoguanidina marcada en el grupo metilo no da lugar a una mayor metilación en la zona de replicación, por lo que este tipo de lesión no es el blanco de la actividad reparadora en la zona de replicación.

La reparación juega un papel importante en la supervivencia después del tratamiento con nitrosoguanidina. Los mutantes deficientes en diferentes pasos de la reparación presentan un incremento en la letalidad: B_S1 (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967a); *polA* (Kondo, 1973; Ishii y Kondo, 1975); *uvrA*, *recA* (Kondo *et al.*, 1970; Ishii y Kondo, 1975) y *lexA* (Schendel *et al.*, 1978).

Igualmente se ha encontrado que mutantes resistentes a la luz ultravioleta, con mayor capacidad de reparación que el tipo silvestre, son más resistentes a la letalidad producida por nitrosoguanidina (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968, Dugle *et al.*, 1973). La bacteria *Micrococcus radiodurans*, mucho más resistente que *E. coli* a la luz ultravioleta es también más resistente a nitrosoguanidina (Sweet y Moseley, 1974, 1976).

Sin embargo, la mayoría de los mutantes deficientes en reparación son igual de mutagenizables por nitrosoguanidina que la estirpe silvestre, excepto los mutantes en los genes *recA* y *lexA* que sufren aproximadamente tres ó cuatro veces menos mutaciones (Kondo *et al.*, 1970; Ishii y Kondo, 1975; Schendel *et al.*, 1978).

El hecho de que *M. radiodurans*, sea igual de mutagenizable por nitrosoguanidina que *E. coli*, en tanto que no es mutagenizable por ultravioleta, apoya la idea de que los efectos letales y mutagénicos de la nitrosoguanidina sean debidos a causas distintas.

Además de la capacidad de reparación hay otros factores que influyen en la letalidad causada por nitrosoguanidina, como son el pH (Adelberg *et al.*, 1965; Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968), la temperatura (Kasahara *et al.*, 1971) y el estado celular de crecimiento (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967b; Dugle *et al.*, 1973).

Recientemente se ha descrito un mecanismo de reparación inducible por agentes alquilantes y específico para daños causados por ellos. Samson y Cairns (1977) demostraron que al cultivar *E. coli* durante 90 minutos en concentraciones bajas de agentes alquilantes, entre ellos la nitrosoguanidina (1 µg/ml), las células se vuelven más resistentes y menos mutagenizables en tratamientos posteriores más intensos por el mismo u otro agente alquilante. Otras observaciones sugieren que esta "adaptación" a los agentes alquilantes se basa en la inducción de un mecanismo reparador de lesiones letales y mutagénicas.

Este mecanismo es independiente del mecanismo de reparación de emergencia inducible por ultravioleta y determinado por los genes *recA* y *lexA* (Witkin, 1976) ya que los mutantes *recA* ó *lexA* son perfectamente "adaptables" a la nitrosoguanidina y la inducción de la reparación por ultravioleta es independiente de la adaptación a nitrosoguanidina (Jeggio *et al.*, 1977).

Los mutantes *polA*, deficientes en la primera polimerasa del ADN no presentan la respuesta adaptativa a los efectos letales pero sí a los efectos mutagénicos (Jeggo *et al.*, 1978). Esto apoya la idea de que la letalidad y la mutagénesis tienen fundamentos moleculares distintos.

Koshinuma *et al.* (1970) determinaron que el grupo metilo de la molécula de nitrosoguanidina es esencial para la letalidad, en tanto que para la mutagénesis es esencial la presencia del grupo nitroso. Esto sugiere igualmente mecanismos distintos para la letalidad y la mutagénesis.

En la hora siguiente al tratamiento de una estirpe *polA* con nitrosoguanidina, la segunda polimerasa del ADN incrementa su actividad cinco veces, pero la tercera no cambia. Este efecto no ocurre en presencia de cloranfenicol (Miyaki *et al.*, 1977). Se pensó que la segunda polimerasa participaría en la reparación inducible por agentes alquilantes. Sin embargo se ha demostrado que la actividad polimerasa II no es necesaria para ninguna función de la respuesta adaptativa, incluso en una estirpe deficiente en polimerasa I (Jeggo *et al.*, 1978). La inespecificidad de este mecanismo para muchos agentes alquilantes sugiere que no es responsable de las peculiaridades de la mutagénesis por nitrosoguanidina.

Los mutantes *dam*, que presentan espontáneamente niveles de 6-metiladenina en el ADN mucho más bajos que las células normales, son particularmente sensibles a la mutagénesis por análogos de bases y por metanosulfonato de etilo pero no por luz ultravioleta.

Las mutaciones espontáneas son también más frecuentes en estos mutantes. Se cree que las estirpes *dam* son deficientes en la reparación de apareamientos incorrectos de bases y que la reparación por excisión de bases mal apareadas tiene lugar preferentemente en la cadena recién sintetizada, usando la metilación dirigida por el gen normal *dam* para discriminar entre las cadenas nuevas (aún no metiladas) y las viejas (metiladas) (Glickman *et al.*, 1978).

6. Mecanismo de mutación

La acción metilante de la nitrosoguanidina sobre el ADN no es su principal mecanismo mutagénico, aunque los apareamientos erróneos inducidos directamente por algunas bases metiladas pueden ser responsables de una parte 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; y aún en el ARN aislado, las condiciones que favorecen la metilación, interfieren con la mutagénesis (Singer *et al.*, 1968).

Por otra parte, la metilación del ADN se distribuye por todo el cromosoma (Scudiero y Strauss, 1976), en tanto que la mutagénesis ocurre preferencialmente en la zona de replicación (Cerdá Olmedo *et al.*, 1968).

La participación de funciones celulares en la mutagénesis por nitrosoguanidina fue primeramente apun-

tada por Kondo e Ichikawa (1973) quienes demostraron la inducción de mutaciones en fagos λ no tratados, al infectar células de *E. coli* pretratadas con nitrosoguanidina. Posteriormente se ha sugerido que la mutagénesis por nitrosoguanidina se debe a un efecto sinérgico entre algún componente celular dañado por el mutágeno y los daños causados directamente sobre el ADN (Yamamoto *et al.*, 1978).

La replicación del ADN es esencial para que se encuentren mutaciones, como se demostró por el ensayo de transformación en *Haemophilus influenzae* (Kimball y Setlow, 1974). El ADN extraído de células recién tratadas con nitrosoguanidina contiene muy pocas mutaciones. La frecuencia de mutaciones en el ADN aumenta con el tiempo de incubación de las células tratadas antes de la extracción del ADN.

Los autores explicaron estos hechos y la especificidad de la nitrosoguanidina por las zonas en replicación, suponiendo que los daños premutacionales afectan a todo el ADN, pero son eficazmente reparados. Los daños premutacionales en las zonas en replicación no son reparados a tiempo y dan lugar a mutaciones (Beattie y Kimball, 1974). Esto está en abierta contradicción con los resultados de Scudiero y Strauss (1976) que demuestran una mayor actividad reparadora en la zona en replicación.

Posteriormente se ha comprobado en *H. influenzae* (Beattie, 1975) y en *E. coli* (Ishii y Kondo, 1975), que los mutantes con defectos en los sistemas de reparación no difieren en sensibilidad a la mutagénesis por nitrosoguanidina salvo los mutantes *recA* y *lexA* que son algo menos sensibles.

Sin embargo, la conexión entre mecanismo de replicación y nitrosoguanidina continúa vigente. La nitrosoguanidina altera notablemente el mecanismo de replicación del ADN mitocondrial (Koike *et al.*, 1975). Asimismo, la frecuencia de mutación en un cultivo continuo de *E. coli* está en función del número de generaciones por día (Nestmann, 1975) o del número de puntos de replicación (Hince y Neale, 1977), en tanto que para el metanosulfonato de metilo, que causa mutaciones a través de la reparación de emergencia dependiente de *recA* y *lexA*, la frecuencia es proporcional al número de copias del gen mutado.

Un posible mecanismo de acción para la nitrosoguanidina, propuesto hace varios años (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967b) supone que la nitrosoguanidina o algún compuesto derivado de ella interacciona con la maquinaria de replicación, induciéndola a cometer errores cuando la replicación se reanuda después del tratamiento; poco tiempo después los componentes defectivos son reemplazados, por lo que las mutaciones quedan limitadas a pequeños segmentos de cromosomas. Según este modelo, la letalidad y la mutagénesis inducidas por nitrosoguanidina serían debidas a causas distintas. Esto explicaría el porqué la supervivencia de un cultivo disminuye constantemente con el tiempo de tratamiento mientras que la frecuencia de mutantes alcanza un nivel y se satura. A mayor tiempo de tratamiento hay más daños letales (posiblemente metilaciones) y por tanto más incisiones en el ADN, mientras que la maquinaria de replicación defectiva es sustituida en poco tiempo por otra nueva, con lo que el nivel de mutaciones no aumenta.

Una hipótesis alternativa es que la frecuencia de mutación observada con nitrosoguanidina se debe en gran parte a la reparación de emergencia dependiente de *recA* y *lexA* (Schendel *et al.*, 1978). Según esta hipótesis la fijación de la lesión premutacional en el ADN depende de una compleja relación entre sistemas reparadores libres de error y mecanismos mutagénicos. Los mecanismos mutagénicos serían la reparación de emergencia, notoria por su escasa fidelidad y, en menor grado, la replicación errónea de las bases metiladas. Sin embargo, no explica el hecho fundamental de que las mutaciones por nitrosoguanidina se producen mayoritariamente en la zona de replicación.

En esta tesis se ha abordado el estudio del mecanismo de acción de la nitrosoguanidina, mediante el aislamiento y caracterización de mutantes inmutables por nitrosoguanidina.

Para detectar las estirpes inmutables por nitrosoguanidina, se ha utilizado un sistema desarrollado previamente en mi tesina de licenciatura y completado en un reciente artículo (Ruiz Vázquez *et al.*, 1978). Este sistema utiliza la bacteria *Salmonella typhimurium* a la que se ha inducido, con nitrosoguanidina, una mutación en el gen *araD* del operón de la arabinosa.

El catabolismo de la arabinosa se lleva a cabo en una serie de pasos catalizados por enzimas, hasta dar lugar a D-xilulosa-5-P (Fig. 1) (Eisenstark, 1967; Gielow *et al.*, 1971). Las proteínas determinadas por los genes *araA*, *araB* y *araD* son inducibles por la arabinosa (Englesberg y Anderson, 1962). El gen *araC* actúa como regulador sobre los genes estructurales. El segmento *araI* es el iniciador y el *araO* el operador (Englesberg *et al.*, 1969; Zubay *et al.*, 1970).

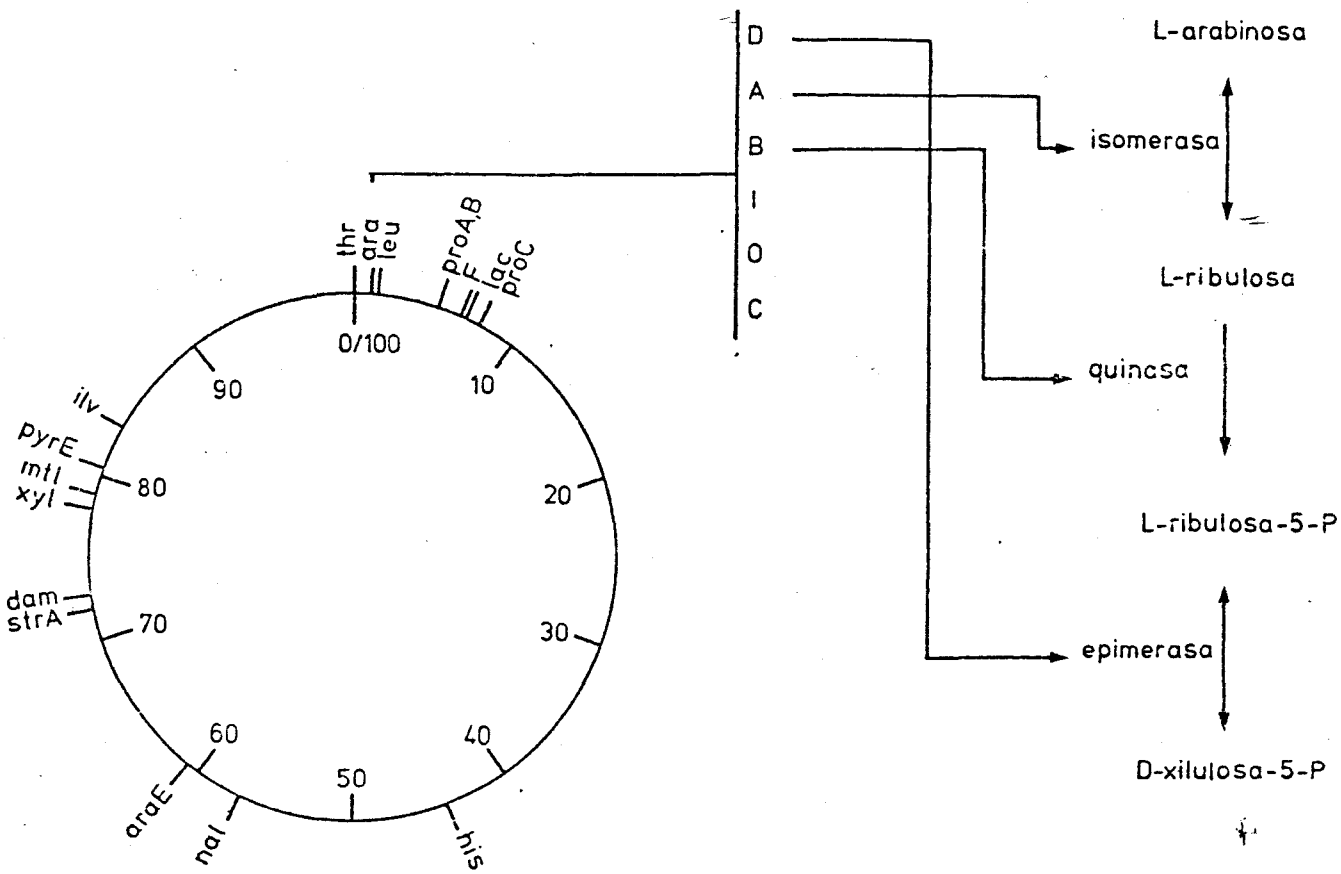


Figura 1. Mapa genético de *E. coli*, indicando la posición de los marcadores mencionados en esta tesis, según Bachmann et al. (1976). Ruta catabólica de la arabinosa y genes que la determinan, según Eisenstark (1967).

La pérdida de la función de los genes estructurales *araA* ó *araB* o del gen regulador *araC* impide a la célula vivir en medio mínimo con arabinosa como única fuente de carbono (fenotipo Ara^-) ya que queda bloqueada la vía catabólica. Estos mutantes son capaces de vivir en presencia de arabinosa y otra fuente de carbono.

El producto acumulado al perderse la función del gen *araD*, L-ribulosa-5-fosfato, es tóxico para la célula (Boyer *et al.*, 1962). Estos mutantes no pueden crecer en arabinosa y otra fuente de carbono (glicerina) que no interfiera con la regulación de la vía de la arabinosa, ya que acumulan el producto tóxico citado. Para que estos mutantes "sensibles a la arabinosa" (fenotipo Ara^S) puedan crecer en medio mínimo con arabinosa y glicerina como únicas fuentes de carbono, comportándose como "resistentes a la arabinosa" (fenotipo Ara^R), necesitan sufrir una de las dos mutaciones adicionales siguientes:

a) Reversión (recuperación de la función normal *araD* con lo que la célula pasaría a ser Ara^+).

b) Una mutación que ocasionara la pérdida de la función de cualquiera de los genes estructurales *araA* ó *araB* o del gen regulador *araC*, con lo que la célula pasaría a ser un doble mutante y no llegaría a acumular el producto tóxico, comportándose fenotípicamente como Ara^- .

La estirpe *S. typhimurium* SV3, con fenotipo Ara^S presenta una mutación en el gen *araD*. Los mutantes Ara^R se obtienen con una frecuencia aproximada de 10^{-3} tras el tratamiento de SV3 con nitrosoguanidina.

Si se trasplantan colonias de SV3 a cajas con arabinosa, glicerina y una concentración subletal de nitrosoguanidina, se obtienen numerosas pequeñas colonias en la zona inoculada, ya que esa concentración de nitrosoguanidina es suficiente para inducir mutantes Ara^R entre las células trasplantadas. Con este método, las estirpes inmutables por nitrosoguanidina se detectarían al dar lugar a un número muy bajo de mutantes Ara^R en esas cajas.

En esta tesis se ha empleado un sistema similar al de SV3, pero utilizando la bacteria *E. coli*. La ventaja de obtener las estirpes inmutables por nitrosoguanidina en *E. coli* es la mayor posibilidad de manipulación genética y el mejor conocimiento de los mecanismos de reparación y replicación en este organismo. Esto facilitaría la comparación de las estirpes obtenidas con otros mutantes conocidos deficientes en reparación y replicación.

MATERIALES

1. *Estirpes bacterianas*

Escherichia coli SE13 es una estirpe Hfr K-12 *lac*, incapaz de utilizar lactosa como fuente de carbono y sensible a la estreptomicina (Lloveres y Cerdá Olmedo, 1973). Transfiere su cromosoma en el orden O-*proB=proA-leu-thr-lac*-F. Deriva de la estirpe Hfr tipo silvestre χ 493 que a su vez procede de la estirpe F⁺ χ 15 (Curtiss y Renshaw, 1969). Esta fue obtenida a partir de la estirpe W1485 (Lederberg y Lederberg, 1953).

Escherichia coli AT3055 es una estirpe F⁻ con genotipo *thr-14, proC22, pyrC73, pyrA74, his-21, pur-73, ilv-18, met-75, pdxC22, tsx, cycA, str-10*. Requiere para vivir treonina, prolina, uracilo, timina, citosina, arginina, histidina, adenina, isoleucina, valina, metionina y piridoxina. Es resistente al fago T6, a la cicloserina y a la estreptomicina.

Escherichia coli MM7 es una estirpe F⁻ derivada de JC1553, con genotipo *argG, leu, metB, his, mal, xyl, lac, gal, str, nal, ilv, pyrE, uhp*. Requiere para vivir arginina, leucina, metionina, histidina, isoleucina, valina y uracilo. Es incapaz de utilizar maltosa, xilosa, lactosa, galactosa y glucosa-6-fosfato como fuentes de carbono. Es resistente al ácido nalidíxico y a la estreptomicina. Enviada por M. Masters, de la Universidad de Edimburgo.

Escherichia coli SE1, derivada de *E. coli* TAU-bar (Hanawalt, 1963), con genotipo *thyA, thyR, arg, met, trp, pyr*. Requiere para vivir timina (basta

2 µg/ml), arginina, metionina, triptófano y uracilo. Es asexual y aflagelada.

Salmonella typhimurium SV3, (Ruiz Vázquez *et al.*, 1978).

2. Fagos

El fago P1 silvestre fue enviado por J.L. Ingraham. Se usó para transducción en *E. coli*. El fago P22 silvestre se usó como marcador de tamaño de ADN. Se multiplicó en *S. typhimurium* SV3. Fue enviado por J.L. Ingraham.

3. Productos químicos

Nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

(¹⁴C-metil)-nitro-nitrosoguanidina, actividad específica 4,2 mCi/mM, 0,05 mCi. Daiichi Pure Chemicals Company Ltd., Tokio, Japón.

Metanosulfonato de etilo, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

Estreptomycin, sulfato de estreptomycin Wassermann, obtenido comercialmente en farmacia.

Penicilina G sódica, Compañía Española de Penicilina, obtenida en farmacia.

Pronasa, libre de nucleasas, Calbiochem, San Diego, California U.S.A.

Lisozima, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

Ribonucleasa A, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

4. *Tampones*

a) *Tampón tris-sales*. Está formado por un 9% de solución A, 90% de agua destilada y 1% de solución B, mezcladas en este orden, ajustado a pH 7,4 y esterilizado en autoclave.

Solución A: Tris (hidroximetil) aminometano, 120 g; agua destilada, 500 ml; disolver; ClH concentrado, 75 ml; ClK, 20 g; PO_4HNa_2 6,6 g; SO_4Na_2 , 3,5 g; agua destilada, 400 ml; ClNH_4 , 20 g.

Solución B: $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g; agua destilada, 100 ml.

b) *Tampón tris-maleato*. Preparado mezclando 50 ml de solución A con solución B en cantidades de 13,1 ml para un pH de 5,5 y 56 ml para un pH de 7,5, añadiendo agua destilada hasta un volumen total de 200 ml. Se ajusta el pH en caso necesario y se esteriliza por filtración (Gomori, 1955).

Solución A: Tris (hidroximetil) aminometano, 24,2 g; ácido maleico, 23,2 g; agua destilada, 1000 ml.

Solución B: 0,2 M de hidróxido sódico.

c) *Tampón calcio-magnesio*, que contiene 4,9 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,147 g de $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 200 ml de agua destilada.

d) *Tampón citrato sódico* preparado 1 M (15,60 g de citrato sódico trihidratado en 50 ml de agua destilada).

e) *Tampón tris-EDTA*, preparado con Tris (hidroximetil) aminometano 0,1 M; ácido etilendiamino tetraacético 0,025 M, ajustado a pH 8,0 ó 7,6 con ácido clorhídrico.

5. Medios líquidos

a) *Medio mínimo*: para todos los cultivos líquidos se usó medio mínimo, salvo que se diga lo contrario. Preparado con tampón tris-sales, 2 g/l de D(+) glucosa y los suplementos requeridos por cada estirpe, en concentración de 20 mg/l los aminoácidos, 10 mg/l las bases y 1 mg/l las vitaminas.

b) *Medio nutritivo*: se empleó el caldo de Luria que contiene 10 g de triptona (Difco), 5 g de extracto de levadura (Difco) y 10 g de cloruro sódico en un litro de agua destilada, ajustado a pH 7,2 antes de autoclavar.

En experimentos de transducción se empleó el medio nutritivo añadiéndole 5% (v/v) de una solución de

Cl_2Ca 0,1 M (2,94 g de $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 200 ml de agua destilada).

6. Medios sólidos

Preparados añadiendo 20 g/l de agar a los medios líquidos. Después de autoclavar, cuando la temperatura era de 45°C, se vertieron aproximadamente 25 ml en cada caja de Petri.

Los mutantes Ara^{R} se seleccionaron en medio mínimo con L(+)arabinosa (2 g/l) y glicerina (2 g/l) en vez de glucosa. Los mutantes Lac^+ se seleccionaron en medio mínimo con lactosa (2 g/l) como única fuente de carbono.

En los experimentos de transducción se empleó el medio nutritivo R, que contiene 10 g de triptona, 8 g de cloruro sódico, 1 g de extracto de levadura y 12 g de agar en 1 litro de agua destilada. Después de autoclavado se añaden 20 ml de cloruro cálcico 0,1 M y 5 ml de glucosa al 20%. El agar de cobertera R se preparó igual que el medio R pero con 8 g/l de agar.

METODOS

1. *Crecimiento*

Los cultivos líquidos se inocularon con una colonia bacteriana y se incubaron a 37°C con aireación hasta fase estacionaria. A continuación se diluyeron 1:50 en medio nuevo y se dejaron crecer hasta una concentración aproximada de 10^8 bacterias/ml, tomando medidas de la densidad óptica a 450 nm con un espectrofotómetro Bausch and Lomb "Spectronic 20".

2. *Enumeración de bacterias vivas*

Después de efectuar las diluciones adecuadas en tampón tris-sales se tomaron muestras que se esperaba contuviesen 100-200 bacterias vivas, y se extendieron en cajas de medio nutritivo, incubándolas a 37°C durante un día. Para cada determinación se sembraron dos cajas y se hizo el promedio de ambas. Se definen como células vivas aquellas que dan lugar a colonias en medio sólido.

3. *Tratamiento con nitrosoguanidina*

La nitrosoguanidina se disolvió en agua destilada (1,0 mg/ml) y se prepararon tubitos con alícuotas de 1 ml. Se guardaron en la oscuridad en congelador hasta el momento de ser usados y en ningún caso se volvieron a congelar.

El cultivo de bacterias en fase exponencial se lavó dos veces por centrifugación con tampón tris-sales y se concentró diez veces en tampón tris-maleato

pH 7,5. Se añadió nitrosoguanidina a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó a 37°C durante 30 minutos, sin aireación. Después del tratamiento las células se lavaron dos veces con tampón tris-sales.

4. Tratamiento con metanosulfonato de etilo

El cultivo de bacterias en fase de crecimiento exponencial se centrifugó y resuspendió en tampón tris-sales con metanosulfonato de etilo 0,1 M. Se mantuvo a 37°C con agitación esporádica durante el tiempo indicado en cada experimento. Cuando se estudió la variación de la letalidad y la frecuencia de mutantes con el tiempo de tratamiento, se tomaron muestras de 1 ml, se filtraron y resuspendieron en tampón tris-sales, sembrándose seguidamente en los medios adecuados.

5. Tratamiento con luz ultravioleta

El cultivo en fase exponencial se centrifugó y resuspendió en tampón tris-sales, exponiéndose a la acción de los rayos ultravioletas emitidos por una lámpara germicida G15T8 de 15W que produce más del 99% de su emisión a 254 nm. Los tratamientos tuvieron lugar en una caja de Petri abierta, con agitación magnética y a una distancia de 50 cm de la lámpara, que se mantuvo encendida aproximadamente 1 hora antes del tratamiento.

A diversos tiempos se tomaron muestras, sin apagar la lámpara, para sembrarlas en agar nutritivo y en medio mínimo con arabinosa y glicerina. Para determinar frecuencias de auxótrofos, se transfirieron las colonias crecidas en agar nutritivo a cajas de medio mínimo con palillos de dientes estériles.

6. Tratamiento con ultrasonidos

El cultivo de bacterias en crecimiento exponencial se centrifugó y concentró en tampón tris-sales. A continuación se rompieron las células con un sonificador Branson "Sonifier B-12" a una intensidad de 70W.

7. Ensayo simplificado de sensibilidad a la luz ultravioleta

Para comprobar la sensibilidad a la luz ultravioleta, se transfirieron del orden de 10^6 células de cada clon a agar nutritivo, se sometieron a una dosis baja de luz ultravioleta (13 J/m^2), y se incubaron a 37°C en la oscuridad durante un día. Las estirpes resistentes presentan crecimiento por toda la zona inoculada, mientras que las sensibles sólo dan lugar a algunas colonias aisladas.

8. *Aislamiento de revertientes resistentes a la luz ultravioleta*

En un experimento de reconstitución se determinó la dosis óptima de luz ultravioleta para detectar clones normalmente resistentes a ultravioleta en un césped de células sensibles sembradas en agar nutritivo. La dosis óptima (13 J/m^2) da lugar a una supervivencia de 0,85 en la estirpe silvestre SE101 y $4,6 \times 10^{-6}$ en la estirpe sensible a ultravioleta SE43.

Para obtener revertientes resistentes a ultravioleta en una estirpe sensible se centrifugó un cultivo en fase de crecimiento exponencial y se trató con una solución 0,1 M de metanosulfonato de etilo durante 60 minutos. Después de centrifugar el cultivo, se resuspendió en medio mínimo y se incubó durante tres horas, al cabo de las cuales se concentró y sembró sobre agar nutritivo y se irradió con 13 J/m^2 de luz ultravioleta. Se comprobó la resistencia a ultravioleta de las colonias que crecieron mediante el ensayo simplificado de sensibilidad a la luz ultravioleta.

9. *Aislamiento de estirpes sensibles a la arabinosa*

Se trató un cultivo exponencial con nitrosoguanidina, resuspendiéndose las células en medio mínimo y cultivándolas durante cinco ó seis generaciones. Al día siguiente, se diluyó y siguió cultivando durante otras cinco ó seis generaciones. Después de centrifugar y lavar dos veces con tampón tris-sales,

las bacterias se resuspendieron en medio mínimo conteniendo arabinosa en vez de glucosa, a una concentración no superior a 10^7 células/ml. Se incubaron durante 1 hora, con aireación, en presencia de penicilina (1000 unidades/ml). De esta forma se realiza una selección a favor de las bacterias incapaces de utilizar la arabinosa, al matar la penicilina a las células que la utilizan. El cultivo se lavó dos veces y se incubó igualmente en presencia de penicilina durante otras 3 horas. Después de centrifugado y lavado, se sembró en cajas de medio mínimo con glucosa. Las colonias obtenidas fueron trasplantadas con palillos de dientes estériles, a cajas de medio mínimo y a cajas de medio mínimo en las que la glucosa había sido sustituida por arabinosa, aislándose las que no crecían en este último medio (Ara⁻).

Para seleccionar estirpes sensibles a la arabinosa, las colonias Ara⁻ fueron trasplantadas a cajas de medio mínimo con glicerina (2 g/l) y a cajas de medio mínimo con arabinosa y glicerina, aislándose como Ara^S las que no crecían en el último medio.

10. *Aislamiento de mutantes espontáneos resistentes a la estreptomycin*

Un cultivo estacionario se centrifugó y concentró en tampón tris-sales y se sembró en agar nutritivo con 100 µg/ml de estreptomycin esterilizada por filtración y se incubó a 37°C durante 1 día. La frecuencia de mutantes resistentes a la estreptomycin espontáneos es de aproximadamente 10^{-8} .

11. *Conjugación interrumpida*

Se centrifugaron y resuspendieron en tampón trisales cultivos exponenciales de las estirpes Hfr y F⁻ y se mezclaron en proporción 1:10. Esta mezcla se mantuvo a 37°C sin aireación y se tomaron cuidadosamente muestras cada 20-30 minutos. Las muestras se agitaron violentamente y se sembraron en agar mínimo con estreptomomicina (100 µg/ml) suplementado con los requerimientos de la estirpe F⁻ excepto aquél o aquéllos para los que se querían seleccionar recombinantes.

Para obtener una agitación suficiente, capaz de separar a las parejas en conjugación, se utilizó el aparato descrito por Low y Wood (1965).

12. *Obtención de lisados del fago P1*

La estirpe sensible al fago se cultivó hasta fase exponencial en medio nutritivo con Cl₂Ca. Un ml de este cultivo se mezcló con 0,1 ml de una suspensión de fagos P1 y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Después de este tiempo se añadieron 2,5 ml de agar de cobertera R, vertiéndolo todo en caja de medio R.

Se incubaron las cajas a 37°C durante 12 horas, al cabo de las cuales se raspó el agar de cobertera y se lavó la superficie de la caja con 1 ml de medio nutritivo con Cl₂Ca. Se centrifugó el agar de cobertera a 15.000 g durante 15 minutos, quedando los fagos en el sobrenadante. Este se filtró, se le añadieron unas gotas de cloroformo, y se guardó en el frigorífico.

13. *Titulación del fago P1*

Un cultivo en fase exponencial de una estirpe bacteriana sensible en medio nutritivo con Cl_2Ca se centrifugó y resuspendió en tampón calcio-magnesio. Se mezcló 1 ml de cultivo con 0,1 ml de diversas diluciones del lisado de fagos, y se incubó a 37°C durante 15 minutos, añadiéndosele seguidamente 2,5 ml de agar de cobertera R. Se vertió todo en cajas de medio R, se incubaron a 37°C durante 1 día y se contaron los halos de lisis aparecidos.

14. *Transducción con el fago P1*

Un cultivo en fase estacionaria de la bacteria receptora en medio nutritivo se centrifugó y resuspendió en tampón calcio-magnesio. Se aireó durante 15 minutos a 37°C.

Se prepararon las mezclas de transducción con 0,5 ml de la suspensión de bacterias y 0,1 ml del lisado de fagos. En los casos en que el lisado tenía un título muy alto, se diluyó 10 veces, de tal forma que la multiplicidad de infección se mantuviese por debajo de 1. La mezcla se incubó 20 minutos a 37°C y se paró la transducción añadiendo tampón citrato sódico en proporción 1:1 v/v.

Se sembraron alícuotas de la mezcla en agar mínimo con todos los requerimientos de la estirpe receptora, excepto aquél o aquéllos para los que se querían seleccionar transductantes, y en agar nutritivo para determinar las bacterias sobrevivientes a los fagos.

15. *Aislamiento de ADN de E. coli*

Un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* SE1 se centrifugó y lavó dos veces con tampón tris-EDTA pH 8,0. Se resuspendieron las células en este tampón y se añadió lisozima a una concentración final de 0,7 mg/ml. Se incubó agitando suavemente en la mano durante 1 minuto. Se añadió poco a poco un volumen igual de una solución que contenía dodecilsulfato sódico al 1,6% y pronasa a 2 mg/ml. Se incubó a 37°C durante 90 minutos.

Para eliminar el ARN se incubó durante dos horas a 37°C con ribonucleasa A, a 100 µg/ml. La ribonucleasa había sido pretratada incubando la solución en tampón a 80°C durante 2 horas, para inactivar posibles enzimas contaminantes. Para desnaturalizar las proteínas que quedasen y facilitar su separación, se añadió perclorato sódico hasta 1 M y se duplicó el volumen con reactivo Sevaj (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1 v/v), se agitó y centrifugó a 7.800 g durante 6 minutos, a una temperatura de 2°C. Se obtienen una fase acuosa y otra hidrófoba, con una masa sólida en la interfase. Se separó y volvió a desproteinizar la fase acuosa hasta que no quedó material sólido en la interfase. El tiempo de agitación del reactivo Sevaj con la preparación aumentó en cada extracción; en la última se dejó toda la noche agitando antes de centrifugar.

Para precipitar el ADN, se añadieron suavemente a la solución acuosa del último centrifugado dos volúmenes de alcohol etílico. Se dejó la mezcla a -20°C

durante 2 horas y se centrifugó a 10.000 g durante 2 horas a una temperatura de 2°C. El precipitado se resuspendió en tampón tris-EDTA pH 7,6 y se dializó durante 12 horas contra 1 litro de este mismo tampón.

La cantidad de ADN se estimó sabiendo que una solución con 50 µg/ml da una densidad óptica a 260 nm de 1,0.

16. *Aislamiento de ADN del fago P22*

Se centrifugó una suspensión concentrada de fagos a 7.800 g durante 10 minutos para eliminar células y fragmentos celulares, y se añadió al sobrenadante un volumen igual de fenol. Se centrifugó a 7.800 g durante 6 minutos a una temperatura de 2°C y se recogió la fase acuosa; se precipitaron los ácidos nucleicos con alcohol y se recogió el ADN centrifugando a 8.000 g durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en tampón tris-EDTA pH 7,6 y se dializó durante 12 horas frente a 1 litro del mismo tampón.

17. *Centrifugación de ADN en gradiente de sacarosa*

Muestras con un volumen de 0,3 ml que contenían 40 µg de ADN en tampón tris-EDTA pH 7,6 se depositaron sobre gradientes lineales de sacarosa del 5 al 20%, de 5 cm de longitud y 3,5 ml de volumen. Se centrifugaron durante 4 horas a 300.000 g, se recogieron fracciones de 4 gotas cada una, y se determinó su densidad óptica a 260 nm.

18. *Incorporación de radioactividad en ADN de células tratadas con (¹⁴C-metil)-nitro-nitrosoguanidina*

Las células de un cultivo en fase exponencial de *E. coli* SE1 se trataron como en el apartado 3, utilizando nitrosoguanidina marcada radioactivamente en el grupo metilo (1,59 mCi/mM). Después de los lavados correspondientes, se resuspendieron las células en medio fresco y se incubaron durante tres horas. Se extrajo el ADN de muestras tomadas en distintos momentos. Para determinar la radioactividad del ADN, se añadieron alícuotas de 0,1 ml de cada solución de ADN a 5 ml de ácido tricloroacético frío al 5%. Después de unos cinco minutos, se filtraron por un filtro Millipore HA (tamaño de poro, 0,45 µm). Se secaron los filtros al aire y se colocaron en viales de centelleo conteniendo 5 ml de tolueno, 8 mg de 2,5-difeniloxazol y 0,45 mg de 1,4-bis(2-5-fenil-oxazolil) benceno. Se contaron en un contador de centelleo líquido Unilux II-A.

RESULTADOS

I. SISTEMA DE DETECCION

1. *Obtención de una estirpe sensible a la arabinosa*

Se trató con nitrosoguanidina un cultivo en fase exponencial de *E. coli* SE13, con una supervivencia de 0,21. Los posibles mutantes incapaces de utilizar arabinosa como fuente de carbono (fenotipo Ara⁻) se contraseleccionaron mediante dos tratamientos con penicilina en los que sobrevivieron 1.7% de las células. Las colonias originadas por los supervivientes sembrados en cajas de medio mínimo con glucosa se trasplantaron a cajas de medio mínimo con arabinosa. De 2000 colonias ensayadas, se obtuvieron 61 mutantes Ara⁻ (aproximadamente un 3%). Para identificar cuáles de estos mutantes eran sensibles a la arabinosa (Ara^S), se probaron en cajas de medio mínimo con arabinosa y glicerina como fuentes de carbono. De los 61 mutantes Ara⁻ probados, 48 fueron incapaces de crecer con una mezcla de arabinosa y glicerina y se consideraron Ara^S.

Nos interesan aquellos mutantes Ara^S que reviertan bien con nitrosoguanidina. Para detectarlos, se extendieron unas 10^7 células de cada estirpe en cajas con arabinosa y glicerina. Se colocaron unos cristales de nitrosoguanidina en el centro de la caja y se incubaron durante dos días a 37°C. Se aislaron cinco estirpes que presentaban un buen halo de colonias resistentes a la arabinosa (Ara^R), de tamaño homogéneo y situadas a unos 2 cm de los cristales de nitrosoguanidina. Las demás estirpes no formaban halos de mutantes Ara^R o el tamaño de las colonias que formaban el halo era muy irregular.

Se estudió, de modo cuantitativo, la frecuencia de mutantes Ara^R inducidos por nitrosoguanidina en las cinco estirpes Ara^S citadas. Para ello se sembraron alícuotas de cultivos de las cinco estirpes tratados con nitrosoguanidina, en cajas de medio mínimo con arabinosa y glicerina, que seleccionan a los mutantes Ara^R. Por si se retrasara la expresión de las mutaciones Ara^R, parte de las células tratadas se cultivaron en medio mínimo con glucosa durante tres horas, al cabo de las cuales se sembraron en cajas con arabinosa y glicerina (Tabla I).

TABLA I. Frecuencias de mutantes Ara^R inducidos por nitrosoguanidina en cinco estirpes Ara^S

Estirpes	Supervivencia	Mutantes/10 ⁴ viables después del tratamiento	Mutantes/10 ⁴ viables después de 3 horas de recrecimiento
1	0,35	2,23	5,5
2	0,61	0,89	2,5
3	0,11	0,172	0,87
4	0,50	0,051	0,013
5	0,038	0,258	0,047

La estirpe 1 presenta la mayor frecuencia de mutantes Ara^R, por lo que se aisló y denominó SE101.

La mutación *lac* de la estirpe SE101 revierte al fenotipo silvestre con una frecuencia de $0,93 \times 10^{-3}$ tras el tratamiento con nitrosoguanidina. SE101 presenta por tanto dos marcadores genéticos que revierten muy bien con nitrosoguanidina y que se pueden usar para detectar mutantes inmutables.

2. Caracterización de la estirpe sensible a la arabinosa

Mediante experimentos de transducción con el fago P22, se había demostrado que el fenotipo Ara^S de *S. typhimurium* SV3 se debe a una mutación en el operón de la arabinosa, dando una frecuencia de cotransducción *leu-ara* de 23,8% (Ruiz Vázquez *et al.*, 1978). Se estudió si la mutación responsable del fenotipo Ara^S de SE101 está situada en el mismo operón. Para ello se realizó un experimento de conjugación usando la estirpe SE101 como donadora y la estirpe AT3055 como receptora. Se seleccionaron recombinantes Thr⁺ Str^R ya que el gen *thr* está muy cerca de *ara* y distal a éste respecto del origen de conjugación. De 200 recombinantes Thr⁺ Str^R obtenidos después de 60 minutos de conjugación, ninguno era Ara^S.

Se repitió el experimento de conjugación entre SE101 y AT3055, seleccionando esta vez recombinantes Thr⁺ Str^R, Ilv⁺ Str^R e His⁺ Str^R (Fig. 2). Se probaron 300 recombinantes de cada tipo, pero ninguno de ellos era Ara^S.

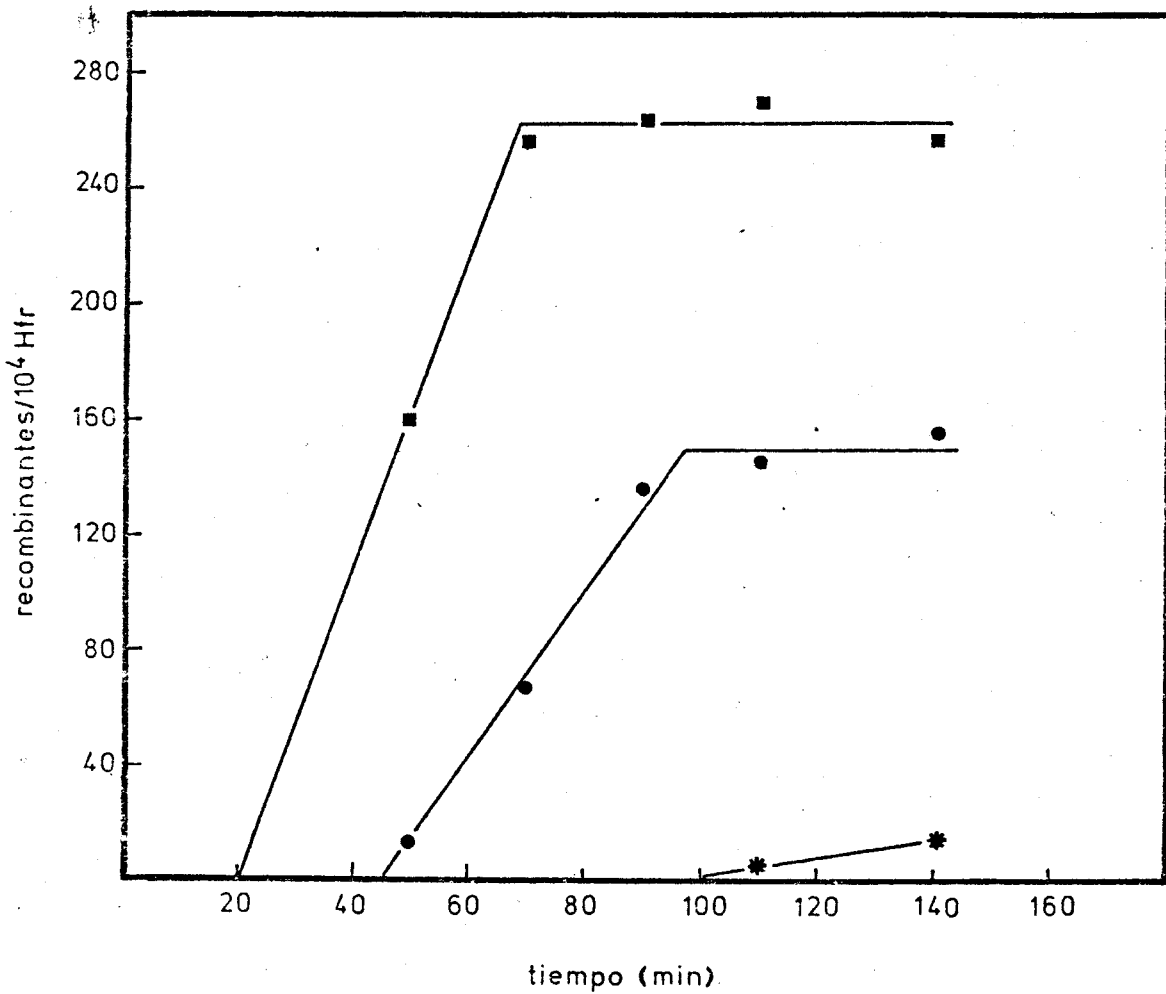


Figura 2. Cinética de transferencia de los caracteres Thr⁺ (■), Ilv⁺ (●) e His⁺ (*) en una conjugación interrumpida entre las estirpes SE101 y AT3055.

De estos resultados se concluye que el fenotipo Ara^S de SE101 se debe a una mutación que no está en el operón *ara* ni en el gen *araE*, que codifica la permeasa de la arabinosa, sino que tiene que estar entre *his* y *proB*.

Para pasar la mutación Ara^S de SE101 a AT3055, se llevó a cabo una conjugación prolongada, seleccionándose un marcador tardío, *proC*. Los recombinantes ProC⁺ Str^R han recibido todo el cromosoma de SE101, por lo que es posible que alguno de ellos lleve la mutación Ara^S. Después de 3 horas de conjugación, la frecuencia de recombinantes ProC⁺ Str^R respecto a los Hfr utilizados fue de $3,8 \times 10^{-5}$. De 300 recombinantes probados, se obtuvieron dos estirpes Ara^S, que se aislaron y denominaron SE47 y SE48.

En experimentos de transducción la mutación Ara^S tampoco aparece ligada a leucina. Se usó un lisado del fago P1 crecido en SE101 con $1,07 \times 10^{10}$ fagos/ml para infectar la estirpe MM7. Después de 30 minutos de incubación, se seleccionaron transductantes Leu⁺. La multiplicidad de infección fue de 1,0 fagos/bacterias y la supervivencia de 0,73. La frecuencia de transductantes Leu⁺ fue de $0,78 \times 10^{-6}$ fagos. Se probaron 500 Leu⁺, no encontrándose ningún Ara^S.

Un resultado aparentemente contradictorio se obtuvo al estudiar la transferencia de los fenotipos Ara⁺ y Thr⁺ de la estirpe SE13 a la SE47 por conjugación (Fig. 3). Los caracteres Ara⁺ y Thr⁺ muestran casi la misma cinética de transferencia, lo que indica que el fenotipo Ara⁻ de la estirpe receptora se debe a una mutación en el operón de la arabinosa.

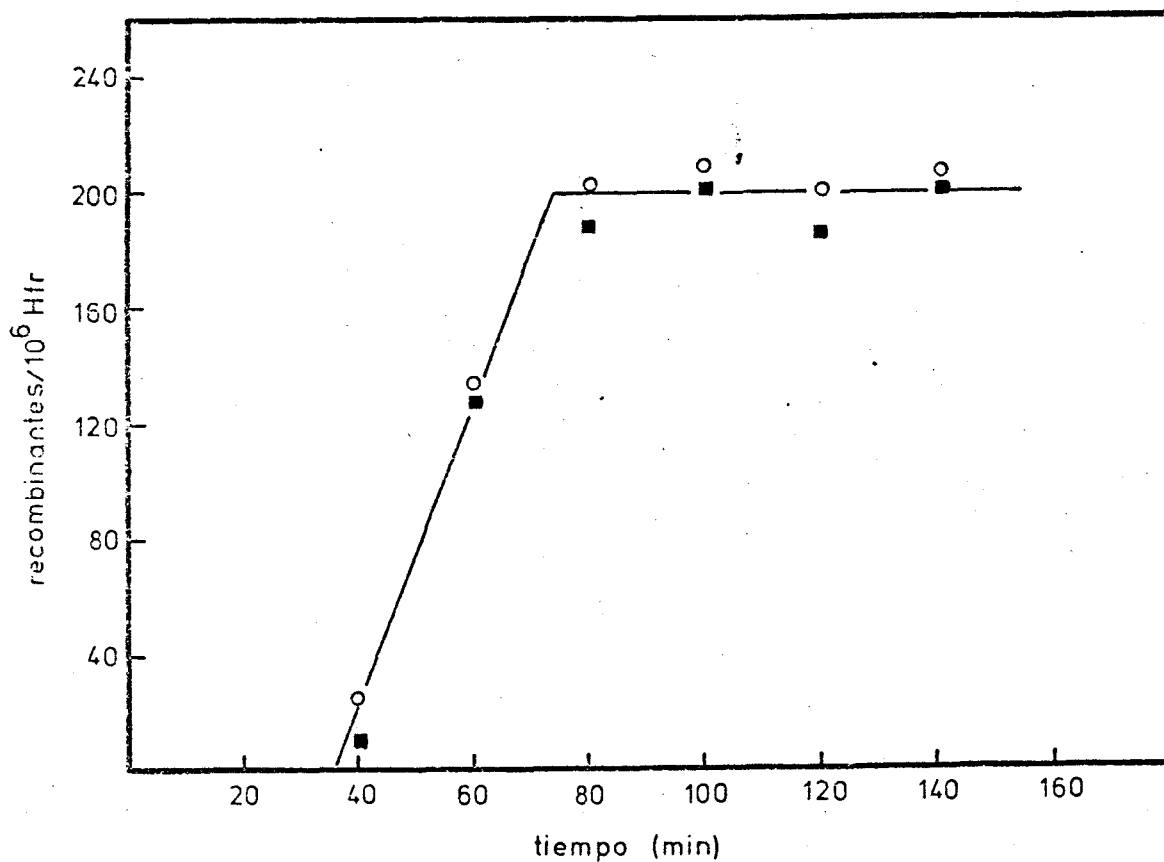


Figura 3. Cinética de transferencia de los caracteres Ara⁺ (O) y Thr⁺ (■) en una conjugación interrumpida entre las estirpes SE13 y SE47.

A la vista de estos resultados, creemos que la estirpe SE101 posee dos mutaciones diferentes relacionadas con la arabinosa: una en el operón *ara*, que le confiere el fenotipo Ara^- y otra entre *his* y *proB*, que le confiere el fenotipo Ara^S permitiendo probablemente la transformación del producto intermedio acumulado por la mutación Ara^- en algún compuesto tóxico.

El tiempo de entrada del carácter Thr^+ y la cantidad de recombinantes $Thr^+ Str^R$ por Hfr obtenida son distintos en las figuras 2 y 3, debiéndose presumiblemente a la distinta capacidad receptora de las estirpes AT3055 y SE47. En experimentos posteriores se manifestó también esta característica, aunque el orden de transferencia de los marcadores y la cantidad relativa de recombinantes de cada tipo permaneció inalterable.

3. Mutaciones que confieren resistencia a la arabinosa

En *S. typhimurium* SV3, los mutantes Ara^R se localizan en el operón de la arabinosa, debiéndose un 4% a reversiones (Ara^+) y los demás a dobles mutaciones en el operón. Se estudió la frecuencia de mutantes Ara^+ entre los Ara^R obtenidos tras el tratamiento de SE101 con nitrosoguanidina. De 500 Ara^R probados, ninguno fue Ara^+ , es decir, la mutación a Ara^R es independiente de la reversión a Ara^+ .

Se determinó por conjugación si las mutaciones Ara^R se localizan en el operón de la arabinosa, estudiando la transferencia de los caracteres Ara^R , Thr^+ e Ilv^+ de dos derivados Ara^R de SE101 a SE47. Los caracteres Thr^+ e Ilv^+ siguieron la cinética usual, pero

en los 160 minutos de conjugación, no se obtuvo transferencia alguna del carácter Ara^R .

Se estudió también la frecuencia de inducción simultánea de mutaciones $Ara^S \rightarrow Ara^R$ y $Leu^+ \rightarrow Leu^-$ en la estirpe SE101. De 900 mutantes Ara^R inducidos en SE101 por nitrosoguanidina sólo el 0,44% fueron simultáneamente $Ara^R Leu^-$. En *S. typhimurium* SV3, el 3% de los mutantes Ara^R son también Leu^- (Ruiz Vázquez *et al.*, 1978). En *E. coli* SE53 el 3,4% de los revertientes $Leu^- \rightarrow Leu^+$ son Ara^- (Guerola y Cerdá Olmedo, 1975). Los datos indican que sólo una minoría de las mutaciones Ara^R de SE101 ocurren en el operón *ara*. Esto coincide con la hipótesis enunciada en el apartado anterior. La segunda mutación está relacionada con el metabolismo de la lactosa, ya que el 93% de los revertientes espontáneos Lac^+ de SE101 son también Ara^R . La relación entre las mutaciones responsables de los fenotipos Lac^- y Ara^S puede ser simplemente la sensibilidad a un supresor intergénico común.

II. AISLAMIENTO DE ESTIRPES INMUTABLES POR NITROSO- GUANIDINA

1. *Aislamiento de posibles estirpes inmutables*

Se trató *E. coli* SE101 con nitrosoguanidina, obteniéndose una supervivencia de 0,29. Por si fuera necesario un tiempo para la expresión de la mutación a inmutabilidad, las células tratadas se cultivaron en medio mínimo durante tres horas, o sea, unas tres generaciones celulares, y se sembraron en cajas con medio mínimo. Las colonias obtenidas después de dos días de incubación se trasplantaron con palillos estériles a cajas de medio mínimo con arabinosa, glicerina y 5 µg/ml de nitrosoguanidina y a cajas de medio mínimo con lactosa y 5 µg/ml de nitrosoguanidina. Esta concentración subletal de nitrosoguanidina es suficiente para inducir mutantes Ara^R y Lac⁺ entre las células trasplantadas. Se obtienen así numerosas pequeñas colonias en la zona inoculada (Fig. 4).

De 7000 colonias ensayadas, ocho no presentaban mutantes inducidos por nitrosoguanidina en ninguno de los dos medios. Se aislaron como presuntas estirpes inmutables por nitrosoguanidina.

2. *Caracterización de las estirpes obtenidas*

Se ensayó la mutagenicidad de la nitrosoguanidina en las ocho estirpes preseleccionadas y en la original, estudiando la aparición de mutantes resistentes a valina y auxótrofos. Después del tratamiento y lavados correspondientes se sembraron muestras en cajas con medio mínimo y valina (250 µg/ml), para determinar

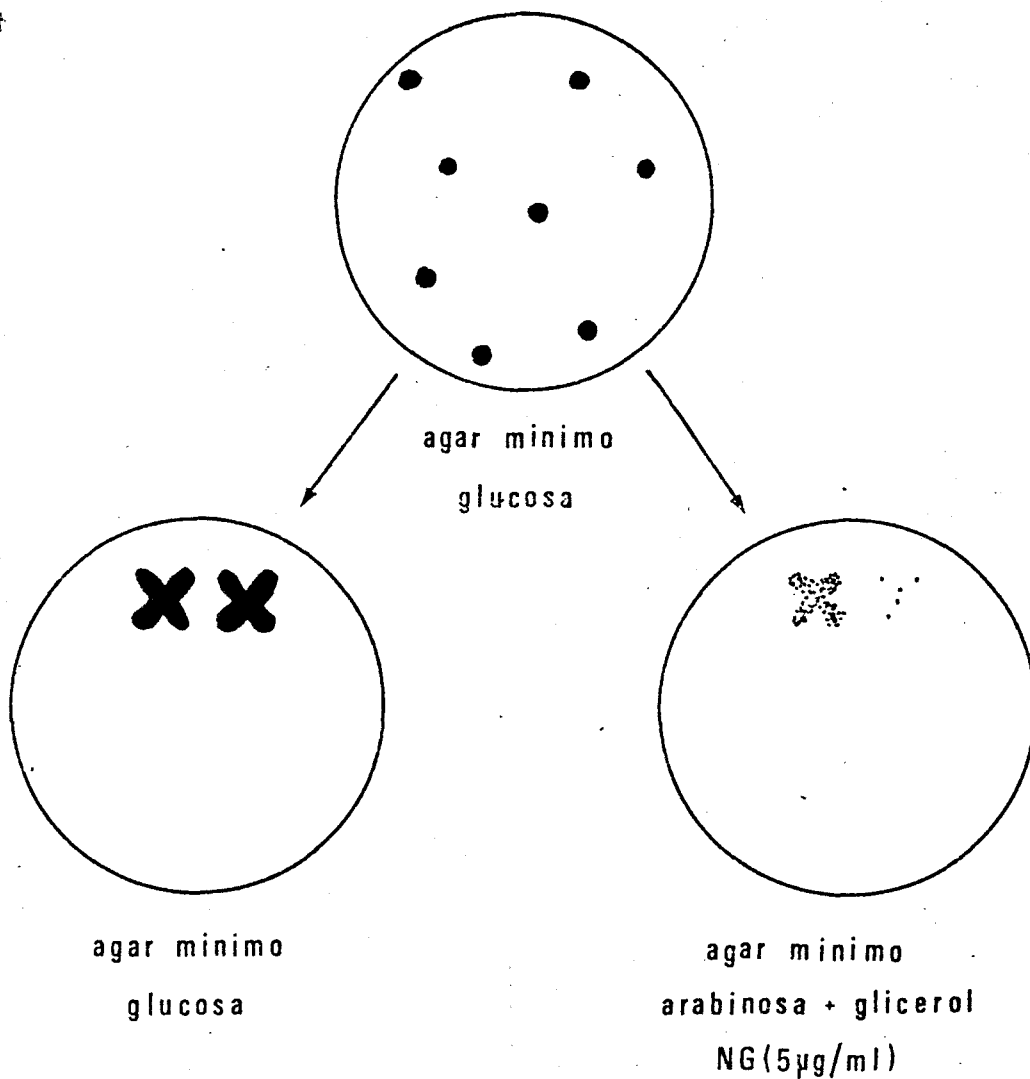


Figura 4. Aislamiento de posibles estirpes inmutables. Observación del crecimiento en cajas con arabinosa, glicerina y nitrosoguanidina de la estirpe original y de una posible estirpe inmutable.

la frecuencia de mutantes resistentes a valina. Para determinar la frecuencia de auxótrofos se cultivaron las células tratadas en caldo nutritivo durante tres horas, se sembraron en agar nutritivo y se incubaron a 37°C durante un día. Se probó el crecimiento en medio mínimo de las colonias obtenidas. La Tabla II indica las frecuencias de mutantes encontradas. La estirpe 8 presenta una frecuencia de auxótrofos sensiblemente menor que la estirpe original y una frecuencia de resistentes a valina indetectable, lo que pone de manifiesto su escasa mutabilidad por nitrosoguanidina. El resto de las estirpes preseleccionadas se comporta en estos ensayos como la estirpe SE101. Las estirpes 2, 3, 5, 6 y 8 son notablemente más sensibles que la original a los efectos letales de la nitrosoguanidina.

Las estirpes preseleccionadas crecen más lentamente que la original, según se refleja en los tiempos necesarios para la duplicación de su densidad óptica (Tabla III). Para una misma densidad óptica, sus cultivos contienen menos células viables que los de la estirpe original (Fig. 5). En algunos casos, al rebasar determinada densidad óptica, disminuye la capacidad de formar colonias.

La escasa viabilidad de las células de las colonias o la alta susceptibilidad a muerte por 5 µg/ml de nitrosoguanidina, podría explicar la preselección de estas estirpes, ya que, al existir pocas células vivas en las cajas selectivas, la nitrosoguanidina podría inducir pocos mutantes. Para comprobarlo se suspendieron colonias de los distintos mutantes, de tamaño semejante, en un volumen pequeño de tampón, y se sembraron seguidamente en cajas de medio mínimo

TABLA II. Frecuencias de mutantes inducidos por nitrosoguanidina (100 µg/ml) en estirpes preseleccionadas como posiblemente inmutables por nitrosoguanidina

Estirpe	Auxótrofos		Resistencia a valina	
	Supervivencia al tratamiento con nitrosoguanidina	Frecuencia de mutantes (por 10 ² viables)	Supervivencia al tratamiento con nitrosoguanidina	Frecuencia de mutantes (por 10 ⁴ viables)
SE101	0,22	5,8	0,25	3,4
Estirpe 1	0,26	2,0	0,17	2,2
" 2	0,056	3,2	0,068	2,3
" 3	0,041	4,6	0,063	1,0
" 4	0,15	3,0	0,21	3,1
" 5	0,042	3,8	0,035	4,0
" 6	0,072	4,2	0,054	1,7
" 7	0,13	4,8	0,22	4,6
" 8	0,011	0,60	0,020	<0,41

TABLA III. Tiempo de generación de la estirpe SE101 y de las ocho estirpes preseleccionadas. Se define como tiempo de generación el necesario para duplicar la densidad óptica en cultivos exponenciales

Estirpe	Minutos
SE101	75
Estirpe 1	95
" 2	90
" 3	120
" 4	120
" 5	170
" 6	120
" 7	90
" 8	110

con glucosa, o con arabinosa y glicerina, unas con nitrosoguanidina (5 $\mu\text{g/ml}$) y otras sin mutágeno. Los resultados aparecen en la Tabla IV. Las colonias de las estirpes 1 y 7 contienen pocas células viables. Las células de las estirpes 2, 3, 5 y 6 son muy sensibles a la letalidad por nitrosoguanidina. La estirpe 4 presenta pocos mutantes resistentes a arabinosa, pero frecuencias normales de otros tipos de mutantes (Tabla II), por lo que debe tener un defecto en el operón *ara*. Estos comportamientos permiten explicar su preselección.

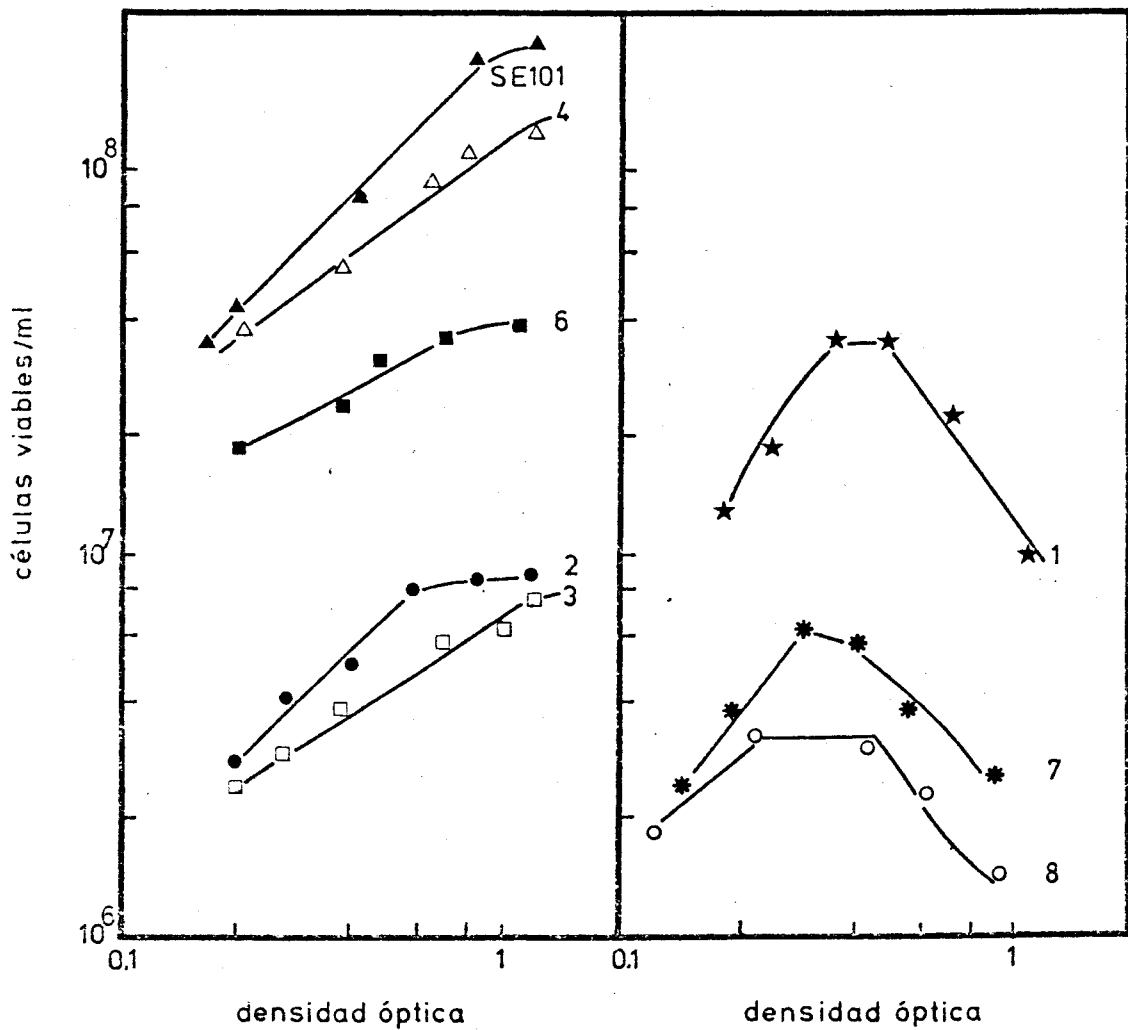


Figura 5. Evolución del número de células viables por ml respecto a la densidad óptica en cultivos de la estirpe original SE101 (▲) y de siete posibles estirpes inmutables por nitrosoguanidina.

TABLA IV. Viabilidad y sensibilidad a nitrosoguanidina de las estirpes preseleccionadas. De cada estirpe se investigaron tres colonias. Se indica la media y desviación típica de los resultados

Estirpe	Células por colonia		Frecuencia de mutantes resistentes a arabinosa (por 10^6 viables)	
	Viables en cajas sin nitrosoguanidina	Viables en cajas con nitrosoguanidina	En cajas sin nitrosoguanidina	En cajas con nitrosoguanidina
SE101	$2,13 \pm 0,93 \times 10^8$	$2,20 \pm 0,75 \times 10^8$	$1,87 \pm 0,66$	$28,67 \pm 3,06$
Estirpe 1	$2,8 \pm 0,74 \times 10^6$	$2,70 \pm 0,24 \times 10^6$	$0,91 \pm 0,91$	$18,17 \pm 2,62$
" 2	$5,15 \pm 0,95 \times 10^7$	$2,11 \pm 0,58 \times 10^7$	$0,82 \pm 0,97$	$15,40 \pm 3,71$
" 3	$6,07 \pm 0,64 \times 10^7$	$7,28 \pm 0,74 \times 10^6$	$0,81 \pm 1,03$	$15,83 \pm 3,54$
" 4	$7,83 \pm 1,21 \times 10^7$	$7,12 \pm 1,32 \times 10^7$	$< 0,30 \pm 0,74$	$4,67 \pm 0,32$
" 5	$4,05 \pm 0,79 \times 10^7$	$9,35 \pm 1,04 \times 10^6$	$1,05 \pm 0,63$	$13,6 \pm 3,21$
" 6	$3,35 \pm 0,99 \times 10^7$	$5,36 \pm 0,67 \times 10^6$	$0,97 \pm 0,70$	$13,0 \pm 2,83$
" 7	$3,1 \pm 1,75 \times 10^6$	$2,93 \pm 1,74 \times 10^6$	$1,9 \pm 0,52$	$35,33 \pm 3,94$
" 8	$2,07 \pm 1,42 \times 10^7$	$1,73 \pm 1,01 \times 10^6$	$1,2 \pm 0,83$	$7,3 \pm 1,20$

Sólo la estirpe 8 se comporta en todos los ensayos como poco mutable por nitrosoguanidina. Es, además, muy sensible a la acción letal del mismo agente. Se le dió la denominación definitiva de SE43. La mutación presuntamente responsable de su escasa respuesta a la acción mutagénica de la nitrosoguanidina se denominó *inm-1*.

III. FENOTIPO DE LA ESTIRPE SE43

1. *Influencia de la letalidad en la frecuencia de mutación*

El tratamiento con cualquier agente letal, aunque no sea mutagénico, puede dar lugar a una elevación aparente de la frecuencia de mutación. Así por ejemplo, las células muertas liberan al medio componentes celulares que pueden facilitar el crecimiento de los supervivientes, al menos durante algunas generaciones. Si durante este crecimiento residual se produjeran mutaciones espontáneas, podríamos observar un aumento en la frecuencia global de mutantes. Este artefacto experimental es conocido de antiguo (Corran, 1971; Jiménez Sánchez, 1974) y ha sido estudiado recientemente por nosotros, encontrando una estirpe de *S. typhimurium* libre de él (Ruiz Vázquez *et al.*, 1978).

Se estudió este efecto en las estirpes SE101 y SE43. Como agente letal no mutagénico se utilizó el ultrasonido. La Fig. 6 relaciona supervivencia y frecuencia de mutantes Ara^R entre los supervivientes. En ambas estirpes se encuentran aumentos de las frecuencias de mutación, que no deben atribuirse a mutagenicidad del agente, sino a consecuencia indirecta del efecto letal.

2. *Letalidad y mutagénesis inducidas por metanosulfonato de etilo*

Se estudió el comportamiento de la estirpe SE43 frente a otro agente alquilante del ADN, el metanosul-

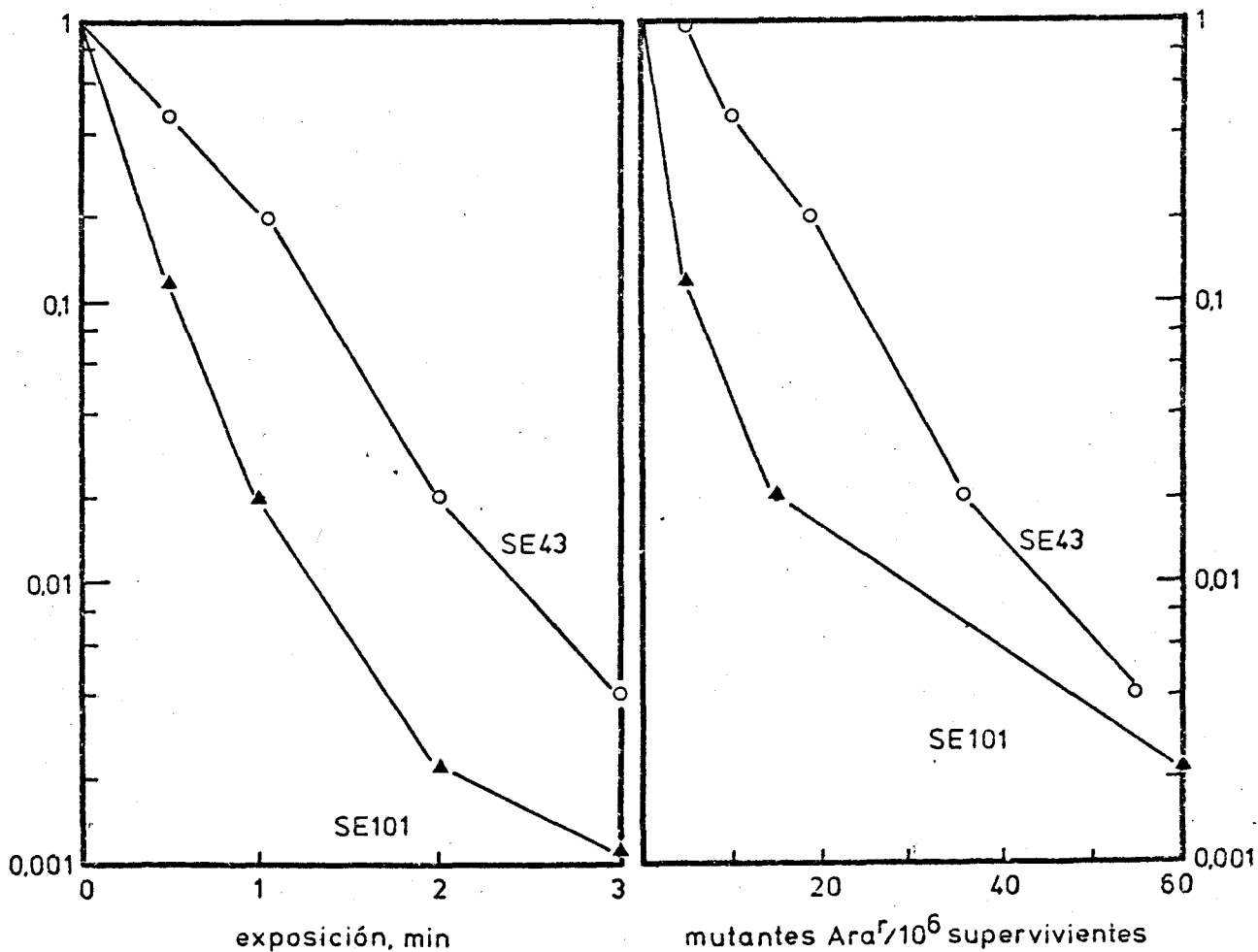


Figura 6. Viabilidad y frecuencia de mutantes Ara^R en cultivos de SE101 (▲) y SE43 (O) expuestos a ultrasonidos. Después de la extracción de cada muestra se esperó unos minutos, para evitar el calentamiento de los cultivos con el tratamiento.

fonato de etilo, comparándolo con el de la estirpe original SE101. Se centrifugaron células en crecimiento exponencial, se resuspendieron en una solución 0,1 M de metanosulfonato de etilo, y se determinó la letalidad y frecuencia de mutantes Ara^R a distintos tiempos (Fig. 7).

Se observa que la frecuencia de mutación es prácticamente la misma en ambas estirpes y superior al nivel debido a efectos meramente letales. La inmutabilidad de la estirpe SE43 no se extiende al metanosulfonato de etilo y, por tanto, no es general para todos los agentes metilantes del ADN.

3. *Letalidad y frecuencia de auxótrofos inducidos por luz ultravioleta*

Se estudió el efecto de la luz ultravioleta en las estirpes SE101 y SE43.

Se centrifugaron células en crecimiento exponencial, se concentraron diez veces en tampón tris-sales y se expusieron a irradiación ultravioleta de 0,67W/m² de intensidad a 254 nm. La Fig. 8 muestra la supervivencia de ambas estirpes en función de la dosis y demuestra la enorme sensibilidad de la estirpe SE43.

La Tabla V muestra la frecuencia de auxótrofos inducidos por la luz ultravioleta en la estirpe SE43, comparándola con la que presenta la estirpe SE101 a la misma dosis y a parecida supervivencia. La estirpe SE43 se comporta como inmutable por ultravioleta. Los resultados se refieren a colonias procedentes de

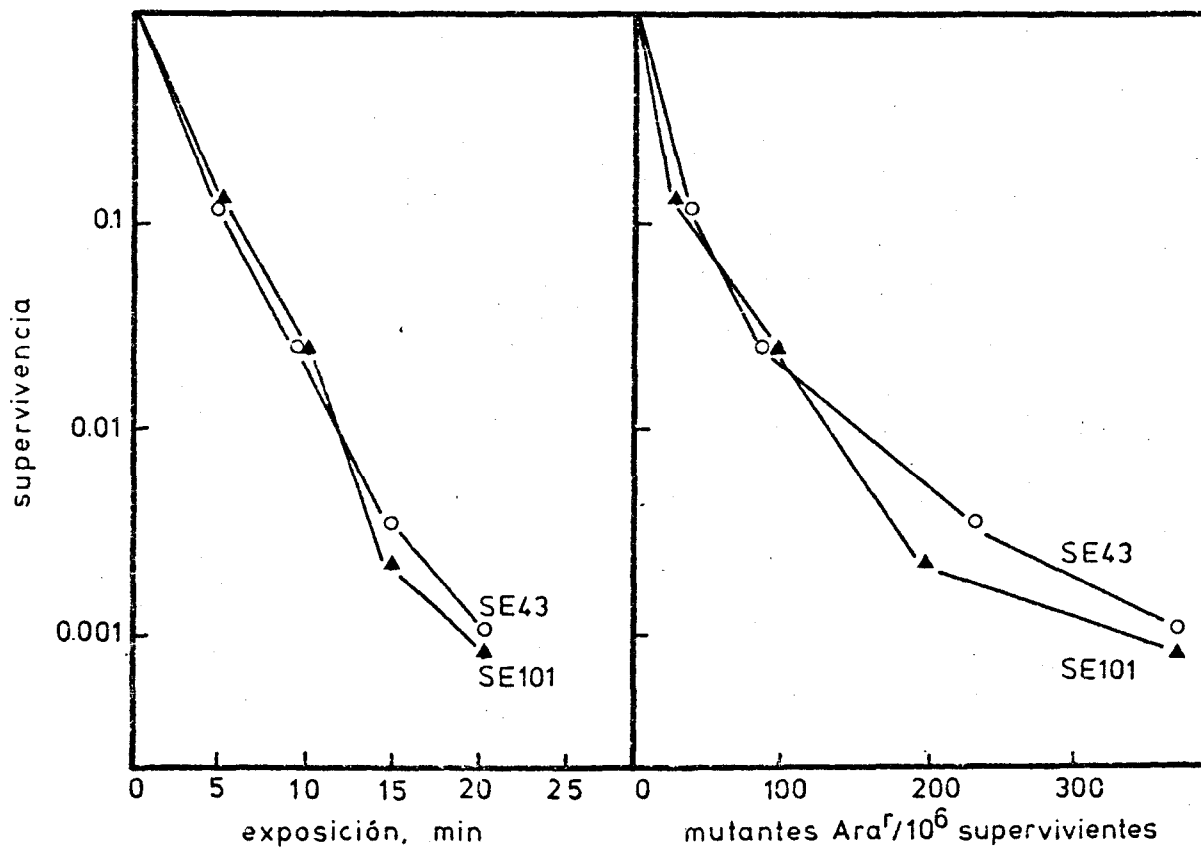


Figura 7. Viabilidad y frecuencia de mutantes Ara^R en cultivos de SE101 (▲) y SE43 (O) expuestos a una solución 0,1 M de metanosulfonato de etilo.

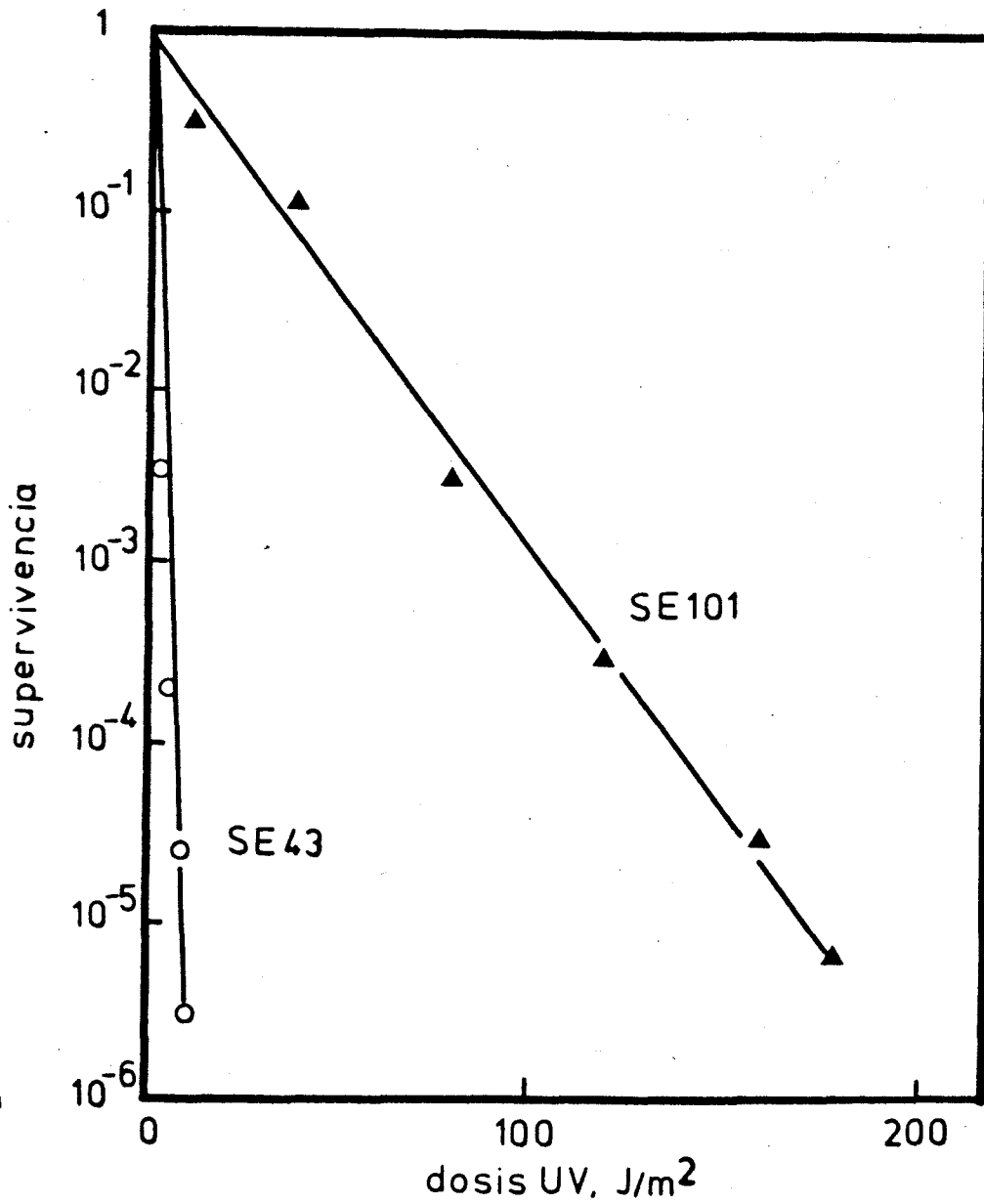


Figura 8. Viabilidad de las estirpes SE101 (▲) y SE43 (○) expuestas a distintas dosis de luz ultravioleta.

células recién irradiadas. La introducción de un periodo de crecimiento entre irradiación y siembra en medio nutritivo no altera el resultado.

TABLA V. Frecuencia de auxótrofos inducidos en SE101 y SE43 por irradiación ultravioleta

Estirpe	Dosis J/m ²	Supervi- vencia	Supervi- vientes probados	Auxótrofos	Auxótrofos %
SE101	180	$6,0 \times 10^{-6}$	5000	14	0,28
SE101	13	$3,6 \times 10^{-1}$	5000	7	0,14
SE43	13	$3,5 \times 10^{-6}$	4800	0	<0,02

4. Frecuencia de mutantes Ara^R inducidos por luz ultravioleta

Para confirmar la inmutabilidad de SE43 por ultravioleta, se estudió la inducción de mutantes Ara^R en esta estirpe y en SE101.

Se centrifugaron células en fase exponencial de ambas estirpes, se resuspendieron en 10 ml de tampón tris-sales, y se expusieron a luz ultravioleta. Se tomaron muestras a distintos tiempos y se sembraron en agar nutritivo, para calcular la supervivencia, y en

medio mínimo con arabinosa y glicerina para calcular frecuencias de mutantes Ara^R. Se volvieron a determinar las frecuencias de mutantes Ara^R tras el tratamiento de ambas estirpes con ultrasonidos. En la Fig. 9 se observa que el aumento de mutantes Ara^R inducidos por ultravioleta en SE43 coincide con el nivel atribuido a efectos puramente letales, confirmando la inmutabilidad de esta estirpe por ultravioleta.

5. Pautas de crecimiento de SE43

Las estirpes que, como SE43, tienen dificultades de crecimiento y viabilidad suelen mejorar sus características tras subcultivos repetidos en el laboratorio.

Se hicieron una decena de cultivos seriados en medio líquido y se volvió a aislar un clon, al que se reserva, en adelante, el nombre de SE43. Las nuevas características de SE43 (Tabla VI) siguen siendo inferiores a las de la estirpe original SE101 sobre todo por la escasa viabilidad. En los cultivos de SE43 se observan pocas células gigantes ("serpientes"), lo que indica que muchas de las células aparentemente normales son incapaces de formar colonias. Las nuevas características son, sin embargo, notablemente mejores que las presentadas inmediatamente después del aislamiento (estirpe 8 en Tabla III y Fig. 5).

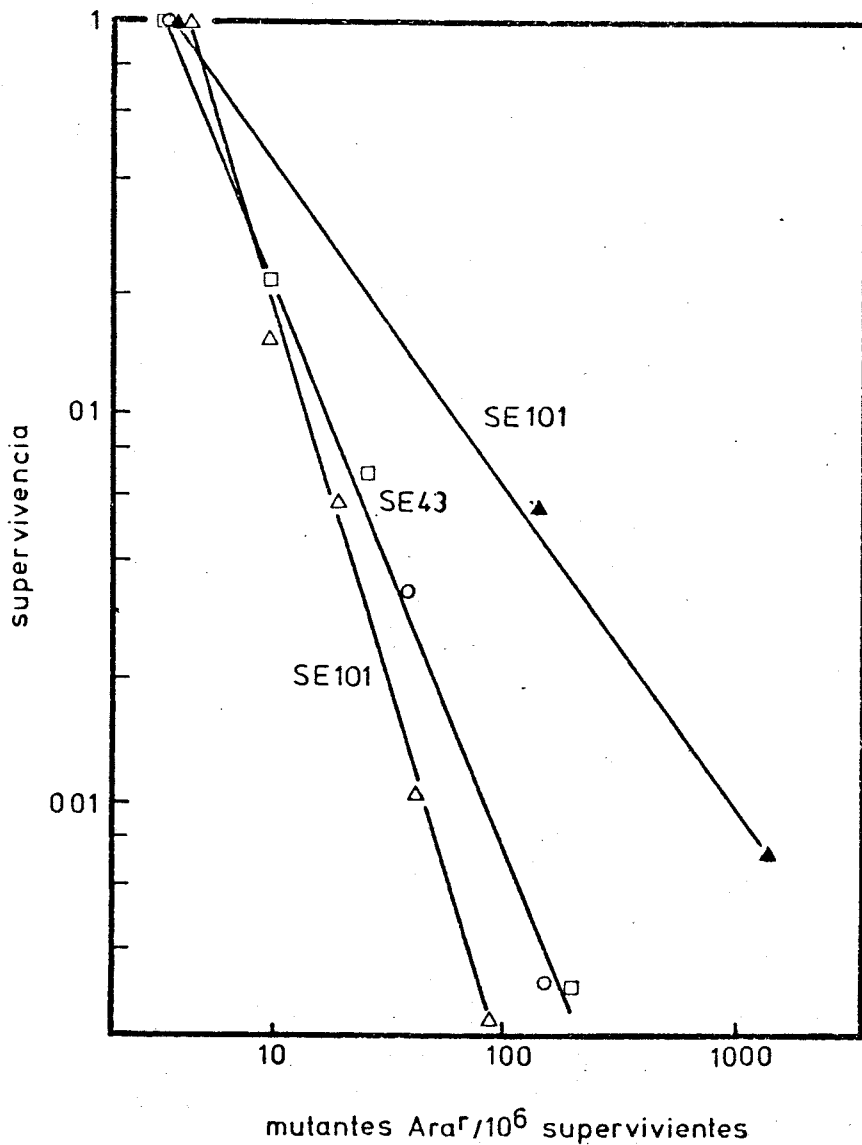


Figura 9. Frecuencia de mutantes Ara^R entre los supervivientes al tratamiento con luz ultravioleta en las estirpes SE101 (▲) y SE43 (○). Se compara con la frecuencia de mutantes Ara^R obtenida tras el tratamiento de ambas estirpes con ultrasonidos, SE101 (Δ), SE43 (□).

TABLA VI. Tiempo de generación y viabilidad de SE101 y SE43

	SE101	SE43
Tiempo de generación ^a		
En medio mínimo	81	93
En medio nutritivo	21	25
Células viables por unidad de densidad óptica ^b	$18,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
Índice de correlación ^b	0,99	0,99

^aTiempo (minutos) necesario para duplicar la densidad óptica en cultivos exponenciales.

^bPendiente de la recta de regresión e índice de correlación para estimaciones de la viabilidad a cinco densidades ópticas diferentes entre 0,04 y 0,80.

IV. LOCALIZACION DE LA MUTACION *inm* POR CONJUGACION

1. Comprobación de la capacidad donante de SE43

Ante todo deseamos comprobar que la estirpe SE43 es un Hfr que transfiere su cromosoma en el orden *O-proB-proA-leu-thr-lac-F* conjugándola con la AT3055 (Fig. 10). Se observa que los genes *thr* e *his* presentan la esperada cinética de transferencia, y se concluye que la estirpe SE43 es un Hfr que se puede utilizar en conjugación como donador del caracter *inm*.

2. Localización de la mutación *inm*

Se estudió la transferencia de los genes *thr*, *ilv* e *his* de la estirpe SE43 a la SE47 (Fig. 11). Los recombinantes $\text{Thr}^+ \text{Str}^R$, $\text{Ilv}^+ \text{Str}^R$ e $\text{His}^+ \text{Str}^R$ obtenidos se probaron en cajas con arabinosa, glicerina y 5 $\mu\text{g/ml}$ de nitrosoguanidina para determinar qué proporción de ellos habían recibido además la mutación *inm*. Todos los 250 recombinantes $\text{Thr}^+ \text{Str}^R$ ensayados eran normalmente mutables por nitrosoguanidina. Seis recombinantes $\text{His}^+ \text{Str}^R$ eran inmutables por nitrosoguanidina. Los datos de los recombinantes $\text{Ilv}^+ \text{Str}^R$ inmutables por nitrosoguanidina obtenidos a distintos tiempos de conjugación aparecen en la Tabla VII. La frecuencia de inmutables aumenta con el tiempo, indicando que *inm* pasa después que *ilv*. Multiplicando los datos de la Tabla VII por los de formación de recombinantes $\text{Ilv}^+ \text{Str}^R$ (Fig. 11) obtenemos la cinética de formación de recombinantes $\text{Ilv}^+ \text{Str}^R$ inmutables incluida en la Fig. 11. Teniendo en cuenta la proporcionalidad entre los tiempos de la figura y las unidades de mapa, se calcula que

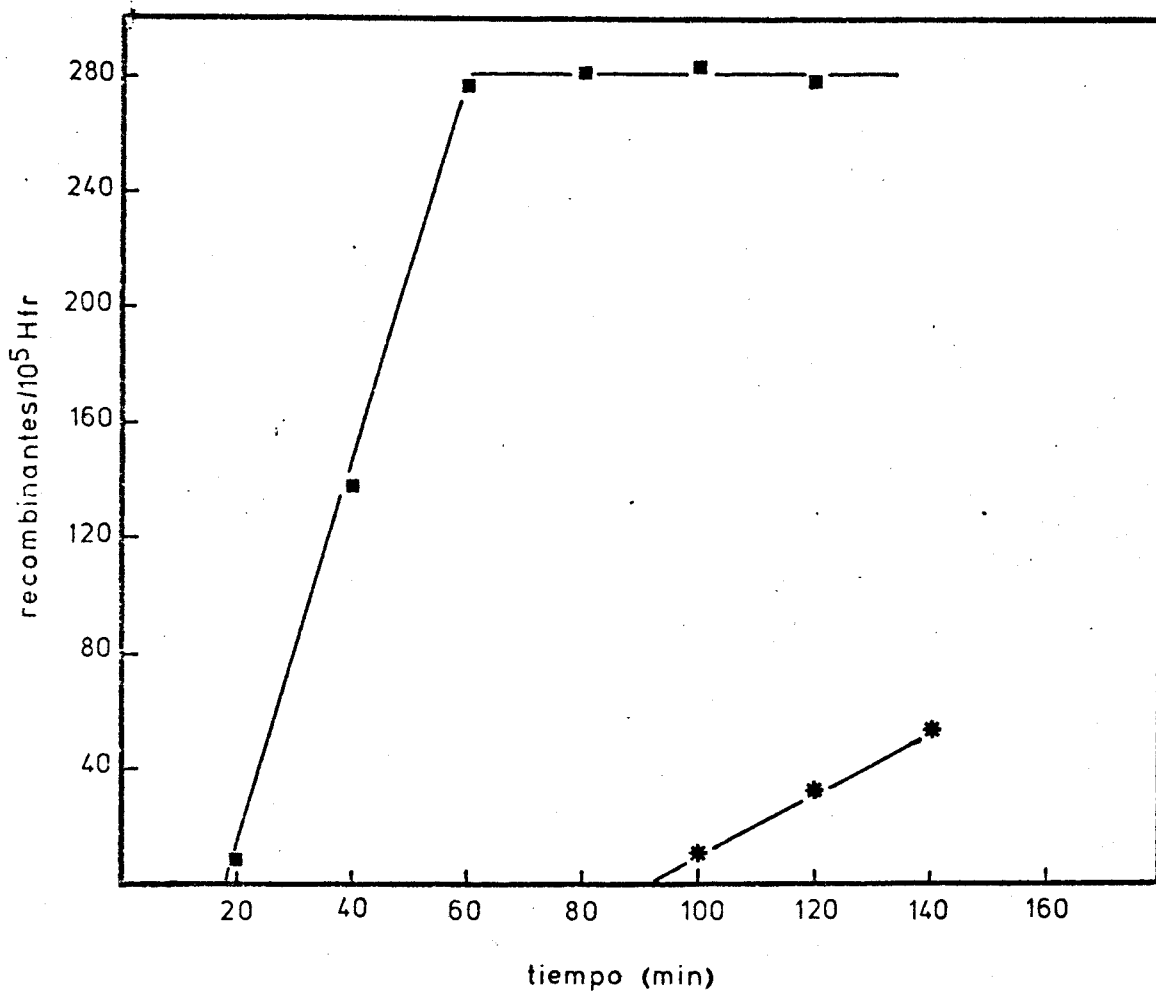


Figura 10. Cinética de transferencia de los caracteres Thr⁺ (■) e His⁺ (*) en una conjugación interrumpida entre las estirpes SE43 y AT3055.

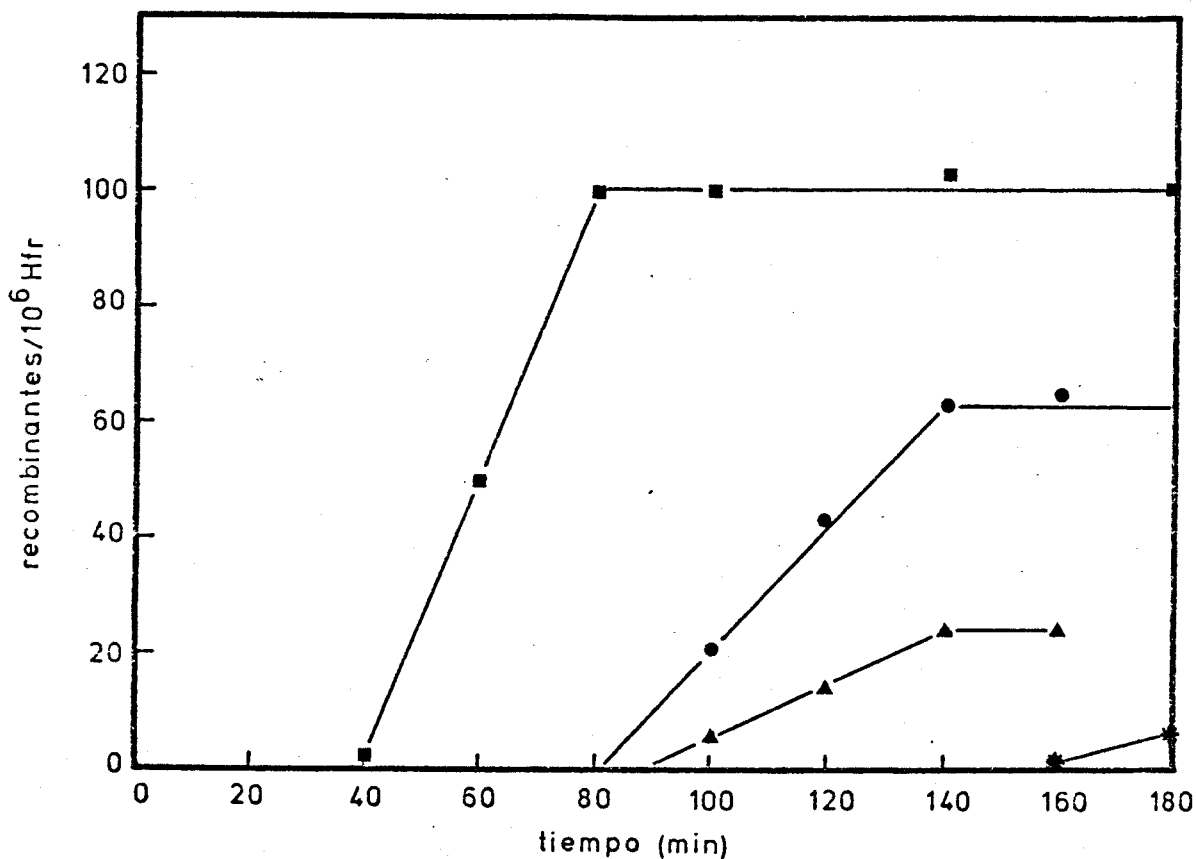


Figura 11. Localización de la mutación inm. Cinética de transferencia de los caracteres Thr⁺(■), Ilv⁺(●) e His⁺(*) en una conjugación interrumpida entre las estirpes SE43 y SE47. La línea ▲—▲ corresponde a la cinética de formación de recombinantes Ilv⁺ Str^R inmutables.

TABLA VII. Mutabilidad por nitrosoguanidina de los recombinantes $Ilv^+ Str^R$

Tiempo de conjugación min	Recombinantes $Ilv^+ Str^R$ estudiados	Proporción inmutables
100	30	0,30
120	41	0,34
140	59	0,39
160	55	0,38

el gen *inm* se encuentra en el minuto 80 del mapa de 100 minutos de Bachmann *et al.* (1976). Como los genes conocidos de esta región del cromosoma no parecen tener relación alguna con el fenotipo de nuestro mutante, creemos que la mutación afecta a un gen desconocido hasta ahora, al que llamamos *inm*.

3. Dos mutaciones distintas en la estirpe SE43

Se aislaron varios recombinantes $Ilv^+ Str^R$ e $His^+ Str^R$ inmutables y se comprobó que mantenían los restantes requerimientos nutritivos de SE47. Se hizo un ensayo simplificado de sensibilidad a la luz ultravioleta. Todos los recombinantes inmutables por nitrosoguanidina resultaron ser resistentes a la luz ultravioleta. Los recombinantes $Thr^+ Str^R$, $Ilv^+ Str^R$ e $His^+ Str^R$ también resultaron ser resistentes a ultravioleta. Esto indica

que el fenotipo de SE43 se debe a dos mutaciones distintas: una responsable de la inmutabilidad por nitrosoguanidina, que asignamos al gen *inm* del minuto 80 del mapa, y otra, situada probablemente entre *his* y *pro*, responsable de la sensibilidad a ultravioleta.

4. Obtención de revertientes resistentes a la ultravioleta en SE43

Si la estirpe SE43 lleva dos mutaciones distintas, sería posible revertir una sin afectar al fenotipo causado por la otra.

Se trataron células de SE43 con metanosulfonato de etilo; entre los supervivientes se encontraron mutantes resistentes a ultravioleta con una frecuencia de $1,3 \times 10^{-6}$; transferidos 39 de estos mutantes a cajas con arabinosa, glicerina y nitrosoguanidina, todos ellos resultaron inmutables por nitrosoguanidina. La reversión de la sensibilidad a ultravioleta no supone reversión de la mutación *inm*. Esto confirma que el fenotipo de SE43 es el resultado de dos mutaciones distintas.

V. ESTUDIO DE LAS DOS MUTACIONES DE SE43

El complejo fenotipo de SE43 se debe a dos mutaciones distintas. Esto hace necesario estudiar qué características fenotípicas vienen determinadas por cada una de las mutaciones.

1. *Sensibilidad a nitrosoguanidina y crecimiento*

Se determinó si la alta sensibilidad a nitrosoguanidina y el mal crecimiento de SE43 dependen de la mutación *inm*. Para ello, se trataron con nitrosoguanidina varios recombinantes $Ilv^+ Str^R$ inmutables determinándose el tiempo de generación, la supervivencia y la frecuencia de auxótrofos en cada uno de ellos. Se estudió también el comportamiento de SE47 como testigo (Tabla VIII). Se observa que todos los recombinantes presentan el tiempo de generación y la resistencia a nitrosoguanidina de SE47, manteniendo sólo la baja frecuencia de auxótrofos de SE43. La mutación *inm* no determina sensibilidad a nitrosoguanidina ni mal crecimiento. Estas características se deben, presumiblemente, a la mutación que confiere sensibilidad a ultravioleta.

El que los recombinantes inmutables presenten una frecuencia de auxótrofos algo más alta que SE43, puede deberse al fondo genético distinto en que se encuentra la mutación *inm*. Se eligió el Recombinante 3 para llevar a cabo los experimentos posteriores, por ser el que presenta una frecuencia de auxótrofos más baja. Se aisló y denominó SE53.

TABLA VIII. Letalidad y frecuencia de auxótrofos inducidos por nitrosoguanidina en recombinantes Ilv^+ Str^R inmutables

Estirpe	Tiempo de generación (min)	Supervivencia	Auxótrofos (%)
SE43	95	0,011	0,60
SE47	65	0,40	4,3
Recombin. 1	65	0,32	0,80
" 2	63	0,38	0,80
" 3	60	0,38	0,78
" 4	60	0,40	1,0

2. Letalidad y mutagénesis inducidas por luz ultravioleta

La Fig. 12 describe la supervivencia de células de SE101, SE43, SE47 y SE53 en función de la dosis de luz ultravioleta. La frecuencia de mutantes Ara^R entre los supervivientes aparece en la Fig. 13.

Se comprueba que SE53 tiene la misma sensibilidad a ultravioleta que SE47 y es más resistente que la estirpe SE101. Todas ellas son mucho más resistentes que la estirpe SE43. La frecuencia de mutantes Ara^R es igual en SE47, SE53 y SE101. Por consiguiente la mutación *inm* no afecta al fenotipo respecto de la luz ultravioleta, ni en cuanto a supervivencia ni en cuanto a mutagenicidad.

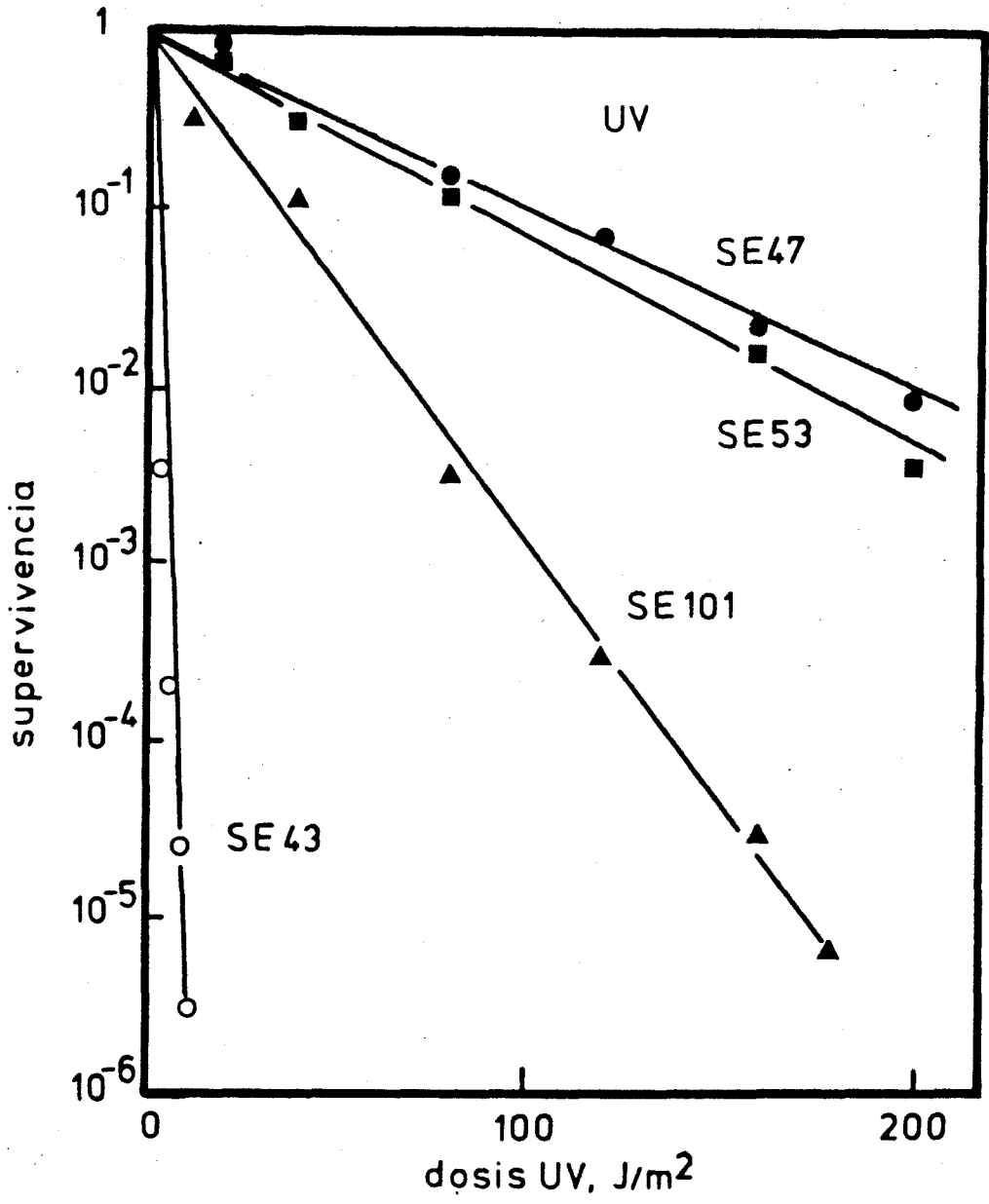


Figura 12. Viabilidad de las estirpes SE47 (●) y SE53 (■) expuestas a distintas dosis de luz ultravioleta. Se compara con la viabilidad de las estirpes SE101 (▲) y SE43 (○).

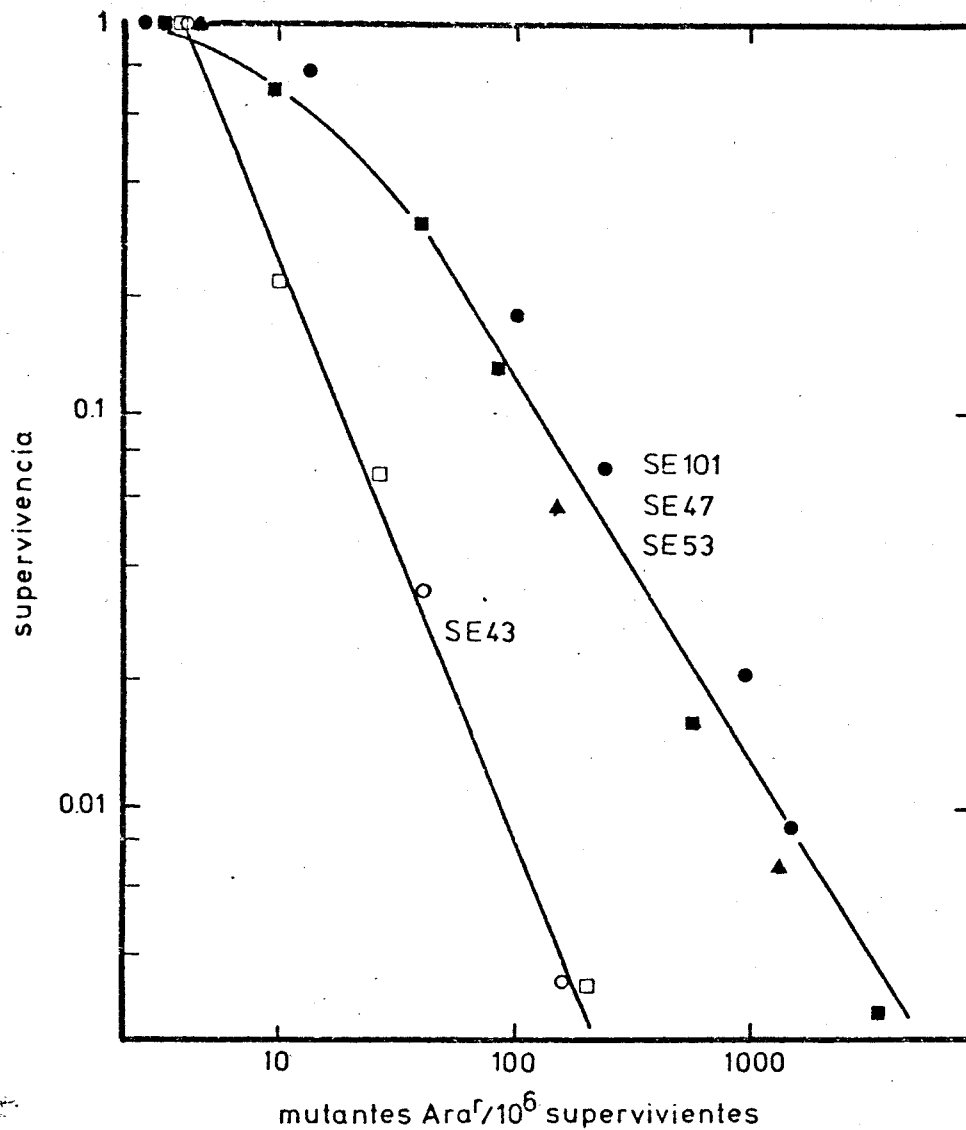


Figura 13. Frecuencia de mutantes Ara^R entre los supervivientes al tratamiento con luz ultravioleta en las estirpes SE47 (●) y SE53 (■). Se compara con las frecuencias de mutantes Ara^R obtenidas en las estirpes SE101 (▲) y SE43 (○) después del tratamiento con luz ultravioleta y en la estirpe SE43 (□) tras el tratamiento con ultrasonidos.

3. Letalidad y mutagénesis inducidas por nitrosoguanidina

La Fig. 14 describe la supervivencia y la frecuencia de mutantes Ara^R inducidos en la estirpe SE53 tras la incubación con 100 µg/ml de nitrosoguanidina durante distintos tiempos. Se compara con la original SE47.

La supervivencia es casi igual en ambas estirpes, en tanto que la inducción de mutaciones es diez veces mayor en la estirpe SE47. La saturación de la frecuencia de mutantes tras un corto período de exposición es una característica ya conocida de la mutagénesis por nitrosoguanidina.

4. SE43 lleva una mutación *recA*

J.E. Rebollo, del Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia, ha comparado el fenotipo de la estirpe SE43 con el de una estirpe silvestre y otras portadoras de mutaciones que afectan a la sensibilidad a ultravioleta. SE43 se comporta como una estirpe mutante *recA*: muy baja supervivencia a ultravioleta, baja supervivencia a rayos X, muy baja frecuencia de recombinación, resistencia a fagos λ de fenotipo Fec⁻ (incapaces de crecer en mutantes *recA*) y sensibilidad a fagos λ Red⁻ (carentes del mecanismo de recombinación generalizada). Por consiguiente SE43 lleva una mutación *recA* además de *inm*.

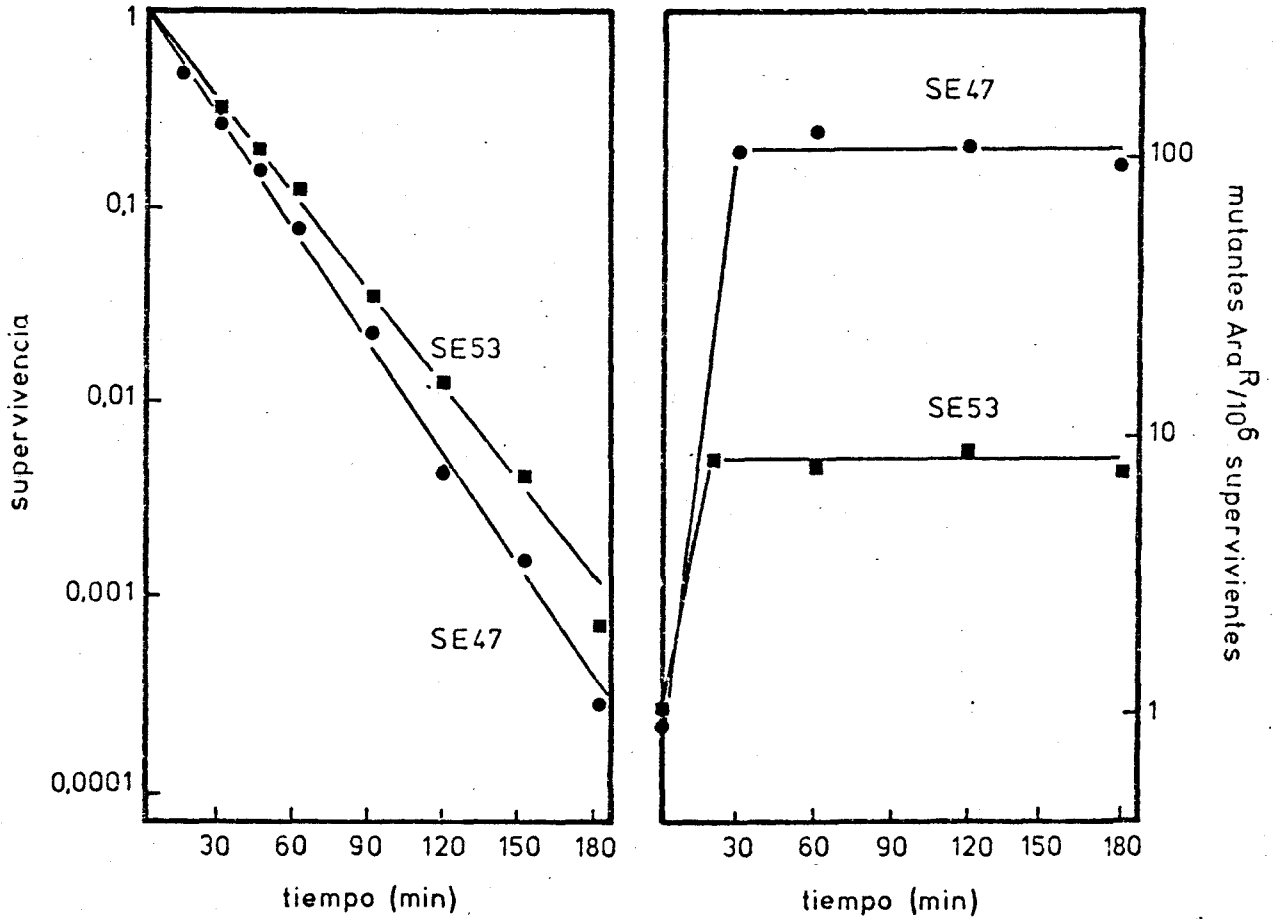


Figura 14. Viabilidad y frecuencia de mutante Ara^R en cultivos de SE47 (●) y SE53 (■) expuestos a 100 µg/ml de nitrosoguanidina durante distintos tiempos. Cada muestra se filtró y resuspendió en un volumen igual de tampón tris-sales antes de sembrarla.

VI. ESTUDIO DE LA MUTACION *inm*

1. Frecuencia de mutación espontánea

Las frecuencias de mutantes Ara^R espontáneos obtenidas en diferentes experimentos en las estirpes *inm*, son iguales a las frecuencias obtenidas en las estirpes originales (Tabla IX). Esto indica que la mutación *inm* no es antimutadora en general, ya que mantiene las frecuencias espontáneas de mutación invariables.

2. Respuesta adaptativa de SE53 a la nitrosoguanidina

La mutación *inm* no está relacionada con la respuesta adaptativa inducida por agentes alquilantes, propuesta por Jeggo *et al.* (1977). Para determinarlo, se cultivó SE53 durante 2 horas en medio mínimo en presencia de diversas concentraciones de nitrosoguanidina y otros 90 minutos en presencia de concentraciones de nitrosoguanidina diez veces mayores (indicadas en abscisas en la Fig. 15). Los cultivos así "adaptados" se expusieron a nitrosoguanidina (60 µg/ml) durante 5 minutos en el mismo medio y se determinaron los efectos letales y mutagénicos de este tratamiento (Fig. 15).

Se observa que SE53 presenta una respuesta adaptativa a la nitrosoguanidina, aumentando la supervivencia y disminuyendo la frecuencia de mutantes a medida que las dosis adaptativas son mayores, hasta que ambas se estabilizan. Esta respuesta es similar a la encontrada por Jeggo *et al.* (1977) con la estirpe sil-

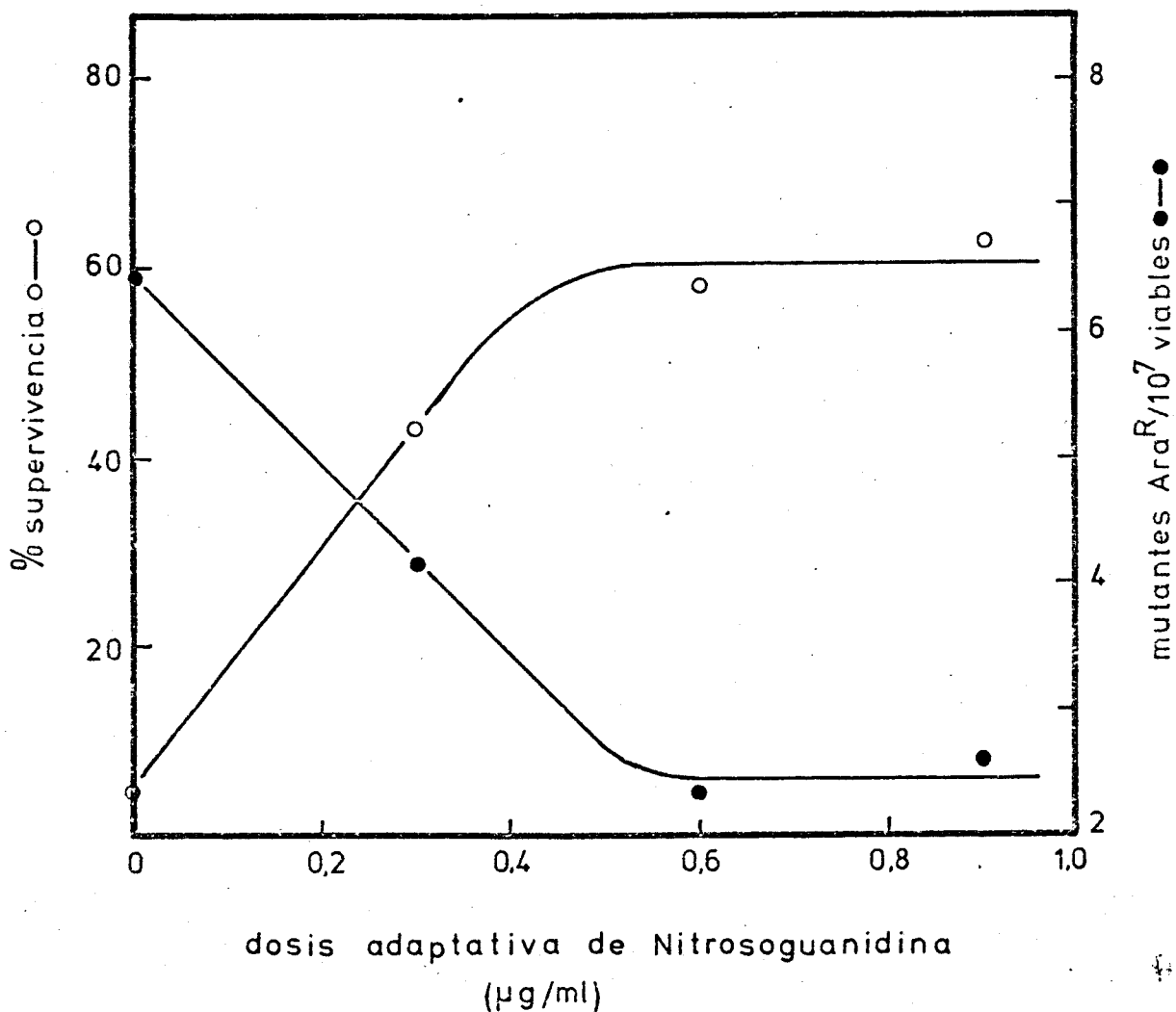


Figura 15. Respuesta adaptativa de SE53 a la nitrosoguanidina. Variación de la supervivencia (O-O) y de la frecuencia de mutantes Ara^R (●-●) en cultivos de SE53 expuestos durante 90 minutos a diversas concentraciones adaptativas de nitrosoguanidina antes del tratamiento con 60 µg/ml del mutágeno.

TABLA IX. Frecuencias de mutación espontánea (media y desviación típica) en las estirpes *inm* y en sus parentales

Estirpe	Nº de experimentos distintos	Frecuencia de mutantes Ara ^R espontáneos (por 10 ⁶ supervivientes)
SE101	11	2,62 ± 1,36
SE43 (<i>inm</i>)	10	2,35 ± 1,08
SE47	3	1,48 ± 0,98
SE53 (<i>inm</i>)	5	1,69 ± 1,11

vestre. El mutante *inm* posee por tanto un mecanismo normal de reparación inducida por agentes alquilantes, tanto para la corrección de lesiones letales como de lesiones mutagénicas.

3. SE53 no es un mutante *dam*

La mutación *dam*, que determina la ausencia de metilación en el ADN, está localizada en el minuto 73. Los mutantes *dam* presentan un comportamiento peculiar respecto a algunos mutágenos que actúan en la zona de replicación, como la bromouridina y la 2-aminopurina. Se estudió por tanto, si la mutación *inm* estaba localizada en el gen *dam*, aunque los datos de conjugación ya indican que no. La mutación *dam* cotransduce un 10% con

estreptomycin, (Marinus, 1973) por lo que se estudió la frecuencia de cotransducción de la mutación *inm* con estreptomycin.

Se usó un lisado del fago P1, obtenido en una estirpe bacteriana resistente a la estreptomycin derivada de SE43, para transducir la estirpe SE101. Después de parar la transducción con tampón citrato sódico, se añadió un volumen pequeño de medio nutritivo y se incubaron las células durante 4 horas. Este crecimiento permite la expresión de la resistencia a estreptomycin en los transductantes. La frecuencia de transducción por fago del carácter de resistencia a estreptomycin fue de $1,83 \times 10^{-5}$. Se probaron 500 de estos transductantes en cajas con arabinosa, glicerina y 5 $\mu\text{g/ml}$ de nitrosoguanidina, y todos ellos dieron lugar a mutantes Ara^R en las cajas. La mutación *inm* por tanto no cotransduce con estreptomycin, por lo que no está situada en el gen *dam*.

4. Localización de la mutación *inm* por transducción

Se deseaba averiguar si la mutación *inm* cotransduce con los marcadores *xyl* (minuto 78,9), *pyrE* (minuto 80,8) e *ilv* (minuto 83,2). Se utilizó un lisado del fago P1, con un título de $9,2 \times 10^8$ fagos/ml, obtenido en SE43, para infectar a la estirpe sensible MM7. La multiplicidad de infección fue de 0,43 fagos/bacterias. La supervivencia de la estirpe MM7 al fago fue del 78%. Se seleccionaron transductantes *Ilv*⁺, *Xyl*⁺ y *PyrE*⁺. Las frecuencias de transducción por fago fueron, respectivamente, $2,09 \times 10^{-6}$, $2,9 \times 10^{-6}$ y $0,88 \times 10^{-6}$. En otro experimento, se utilizó un lisado del

fago P1 obtenido en SE53 y se seleccionaron transductantes Xyl⁺.

Entre los transductantes, se estudió si alguno había incorporado la mutación *inm*. No se pudo utilizar el método usual de detección del fenotipo inmutable porque el receptor MM7 no es sensible a la arabinosa. Por tanto, se analizaron las frecuencias de auxótrofos inducidas por nitrosoguanidina en varias colonias transductantes de cada tipo. Como testigo, se analizó la frecuencia de auxótrofos en colonias de SE43, SE53 y MM7 (Fig. 16).

Las colonias de SE43 y SE53 son, como esperábamos, inmutables por nitrosoguanidina (frecuencia de auxótrofos $\leq 0,3\%$) y las de MM7 son normales. Los transductantes *Ilv*⁺ y *PyrE*⁺ son todos normalmente mutables por nitrosoguanidina, luego *inm* no cotransduce apreciablemente con *ilv* ni con *pyrE*. De 18 transductantes Xyl⁺ ensayados, siete dan frecuencias de auxótrofos menores o iguales del 0,3%. Por consiguiente *inm* cotransduce con *xyl*. La frecuencia de cotransducción se puede situar en aproximadamente el 40%.

Estos resultados, junto con los de conjugación (apartado IV) localizan a la mutación *inm* en el minuto 79,5 del mapa genético de *E. coli*.

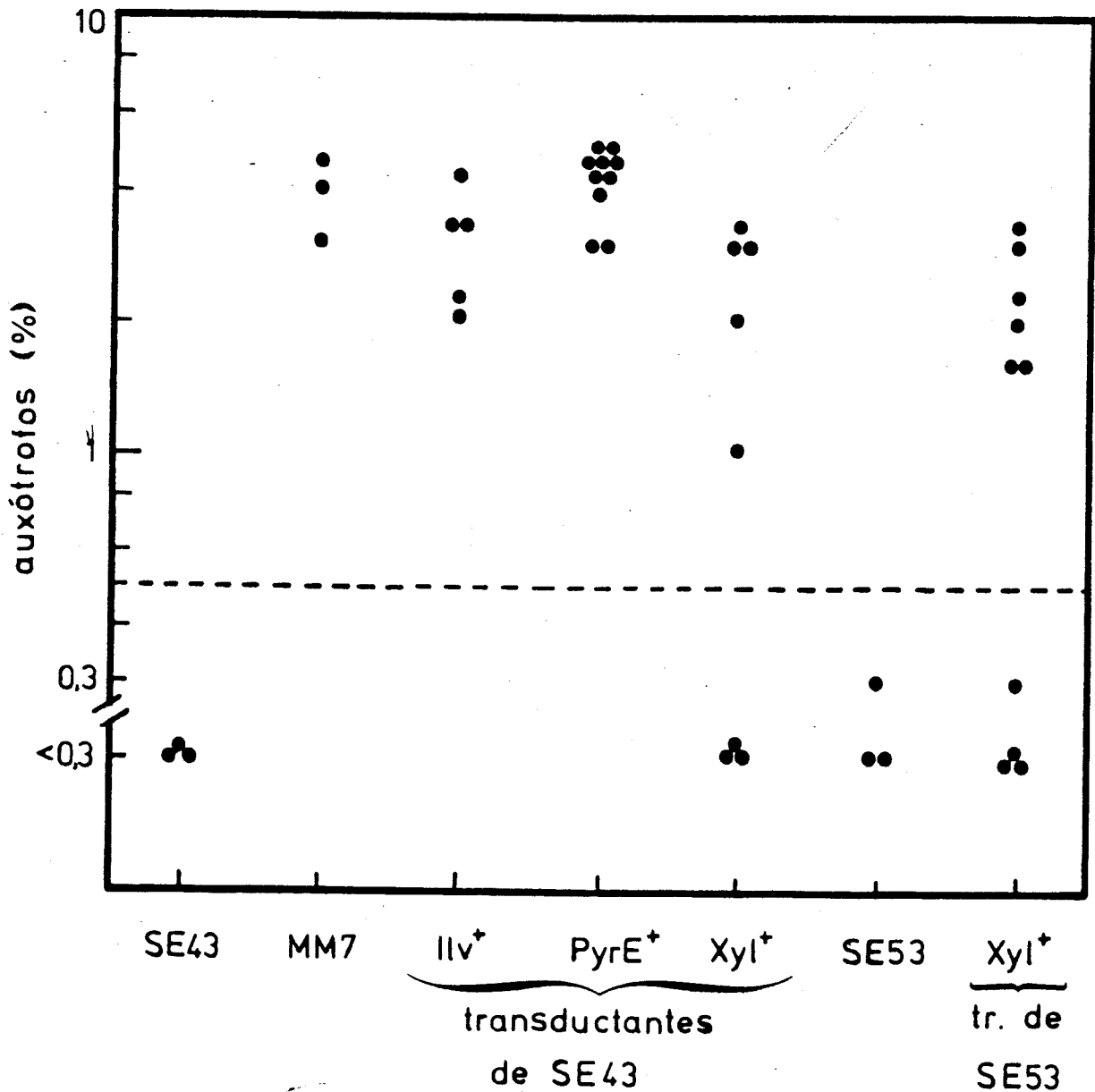


Figura 16. Frecuencias de auxótrofos inducidos por nitrosoguanidina en diversas colonias de las estirpes SE43, SE53, MM7 y transductantes Ilv^+ , $Pyre^+$ y Xyl^+ .

Se mantuvieron las células de cada colonia en tampón tris-maleato, pH 7,5, con nitrosoguanidina (100 $\mu\text{g/ml}$), durante 30 minutos a 37°C, se diluyeron 1000 veces en tris-sales, se sembraron en agar nutritivo y se determinó la auxotrofia o prototrofia de 300 de las colonias resultantes.

VII. EFECTO DE LA NITROSOGUANIDINA SOBRE EL ADN DE *E. coli*

1. *Disociación del ADN*

Se aisló ADN de células SE1 sin tratar o tratadas con nitrosoguanidina. El índice $I = \frac{D.O.260 - D.O.320}{D.O.280 - D.O.320}$, que relaciona las densidades ópticas a distintas longitudes de onda, fue de 2.0 en el primer caso y 1.9 en el segundo, lo que indica suficiente purificación del ADN.

En este experimento y en el siguiente las células se trataron con 1 mg/ml de nitrosoguanidina, durante 1 hora, a 37°C en tampón tris-maleato pH 5.5.

Se llevó a cabo la disociación de estas muestras de ADN, calentando 3 ml de tampón tris-EDTA pH 7.6 que contenían 45 µg de ADN, desde 40°C hasta 100°C con un programador de temperaturas. El incremento de temperaturas fue de 1°C/minuto. La disociación del ADN de células no tratadas coincide con la esperada de una muestra de ADN de alto peso molecular de esta especie ($T_m = 90^\circ\text{C}$). La disociación del ADN de células tratadas con nitrosoguanidina indica que una parte considerable del ADN está roto en fragmentos de distintos tamaños (Fig. 17).

2. *Tamaño del ADN según centrifugación en gradientes de sacarosa*

Para estudiar la fragmentación del ADN por la nitrosoguanidina, se llevó a cabo una centrifugación en

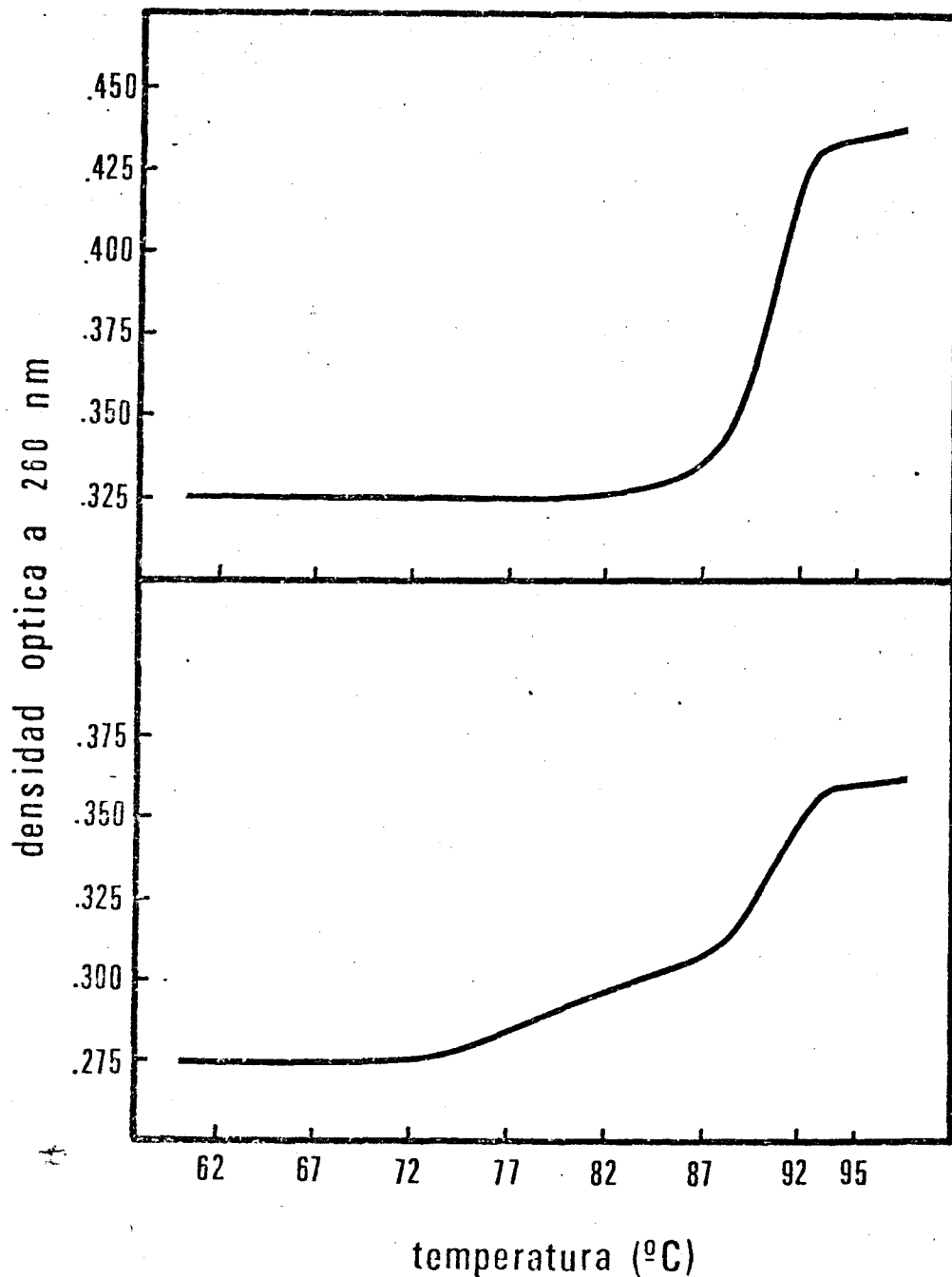


Figura 17. Disociación del ADN en función de la temperatura. Variación de la densidad óptica a 260 nm de dos soluciones de ADN de *E. coli* SE1 en tampón tris-EDTA pH 7,6. Arriba, ADN nativo. Abajo, ADN de células tratadas con 1 mg/ml de nitrosoguanidina.

gradiente de sacarosa de muestras de 40 µg de ADN de células tratadas o no. Se determinó la densidad óptica a 260 nm de las fracciones obtenidas (Fig. 18). Como marcador de tamaño conocido se realizó un gradiente con ADN del fago P22, cuyo peso molecular es de 29 megadáltones. El máximo de absorción del ADN del fago P22 se encuentra en la fracción 15.

Puede observarse que el pico correspondiente al ADN nativo es único, más estrecho y con una velocidad de sedimentación mayor. Según la relación $\frac{D_2}{D_1} = \left(\frac{M_2}{M_1}\right)^{0,35}$, que relaciona las distancias al menisco y los pesos moleculares del ADN conocido y desconocido, el ADN nativo presenta un componente de unos 73 megadáltones. El ADN de células tratadas presenta dos picos con mayor amplitud y con una velocidad de sedimentación menor, lo que indica una gran variabilidad de tamaños, con un componente de unos 29 megadáltones y fragmentos menores. Esta variabilidad de tamaños no puede deberse a que el ADN se encuentre fragmentado en la célula, ya que la rotura simultánea de ambas cadenas es letal y, en las condiciones de tratamiento con nitrosoguanidina empleadas, se observa escasa letalidad.

Presumiblemente la variabilidad de tamaños se debe a incisiones en una cadena de ADN, provocadas por la reparación de los daños inducidos por la nitrosoguanidina. La mejor forma de comprobar esta hipótesis es utilizando gradientes de sacarosa alcalinos, en los que el ADN se encuentra disociado. Sin embargo, por dificultades técnicas surgidas en el curso del trabajo éste no pudo llevarse a cabo.

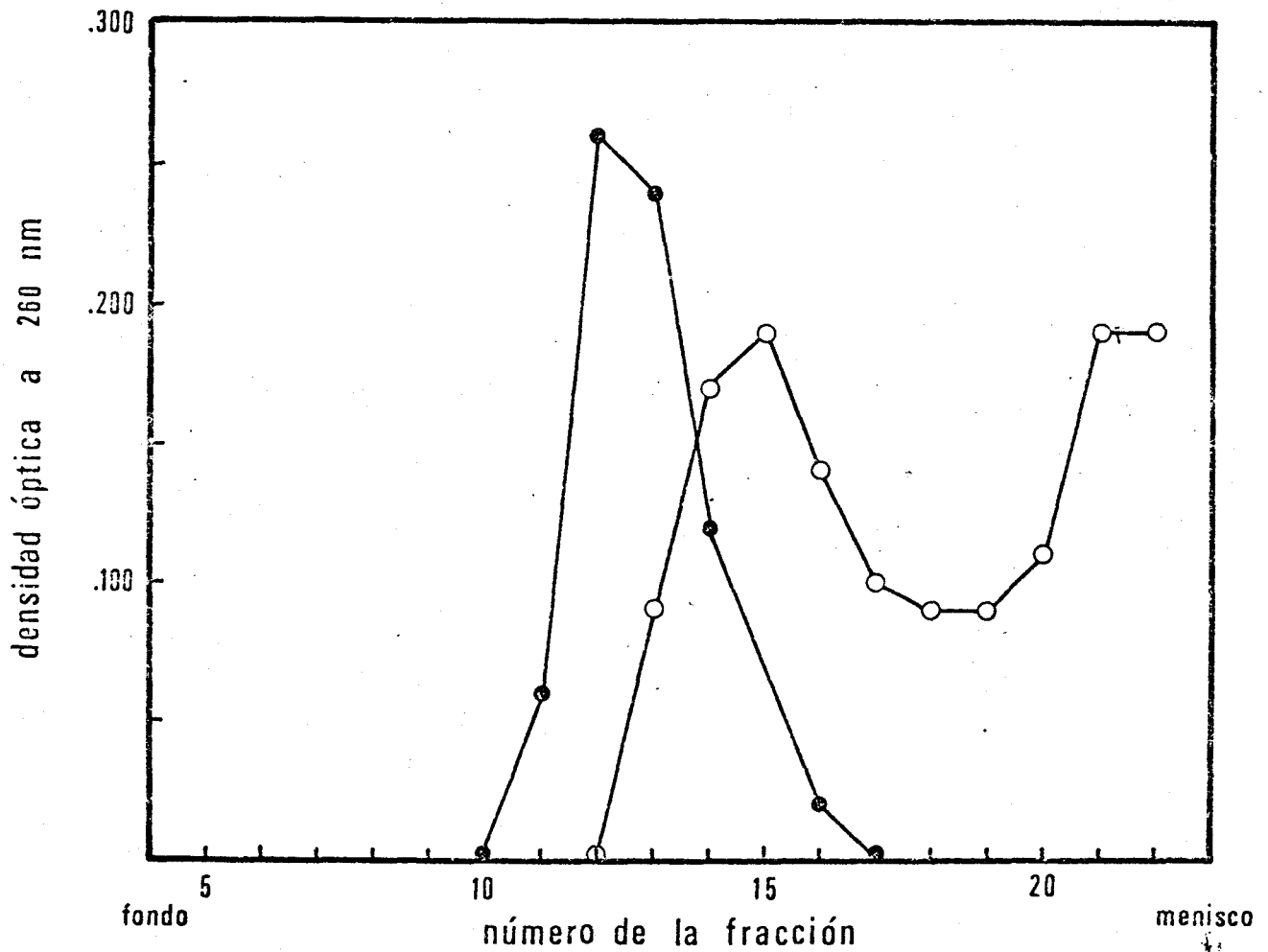


Figura 18. Tamaño del ADN según centrifugación en gradientes de sacarosa. Densidad óptica a 260 nm de las fracciones obtenidas en un gradiente lineal de sacarosa de ADN nativo (●) y de ADN de células tratadas con 1mg/ml de nitrosoguanidina (○).

3. *Reparación de las metilaciones en el ADN inducidas por nitrosoguanidina*

Se estudió la metilación del ADN por nitrosoguanidina y la reparación con el tiempo de los grupos metilos incorporados.

Para ello se trató un cultivo en fase exponencial de *E. coli* SE1 con nitrosoguanidina marcada radioactivamente en el grupo metilo y se analizó la radioactividad incorporada en el ADN a distintos tiempos después del tratamiento. Se midió también la radioactividad total incorporada por la célula en material insoluble en ácido (Tabla X).

La radioactividad incorporada en ADN supone menos del 10% de la radioactividad total incorporada por la célula en macromoléculas (material insoluble en ácido). El resto queda atrapada en proteínas y ARN, que también reaccionan con la nitrosoguanidina. Los datos sugieren que no hay reparación apreciable de los grupos metilos incorporados al ADN, al menos en las tres horas siguientes al tratamiento. Esto está de acuerdo con la observación de que la N⁷-metilguanina, el derivado metilado que se forma en mayor cantidad tras el tratamiento con nitrosoguanidina, no es objeto de reparación.

Según esto, la reparación inducida por nitrosoguanidina actuaría sobre un tipo de daño distinto no relacionado con la mayoría de las metilaciones.

TABLA X. Radioactividad incorporada en ADN de células tratadas con (^{14}C -metil)-nitro-nitrosoguanidina

Incubación tras tratamiento min	Material estudiado	cpm ^a	Cantidad ADN μg	cpm/ μg ADN
0	Insoluble en ácido	15200	-	-
	ADN	896	86,4	10,37
30	ADN	1600	107,2	14,93
60	ADN	2112	238,4	8,86
180	ADN	1248	100,8	12,38

^acpm = cuentas por minuto. Cada muestra se contó al menos durante 10 minutos, dos veces.

DISCUSION

1. *Sistema de detección de estirpes inmutables por nitrosoguanidina*

El sistema de detección de estirpes inmutables por nitrosoguanidina se basa en rasgos fenotípicos que mutan con alta frecuencia. Este hecho es esencial: el trasplante de las colonias a las cajas selectivas con nitrosoguanidina se realiza con palillos de dientes. Se trasplantan así del orden de un millón de células de cada colonia. Es necesaria, por tanto, una alta frecuencia de mutación para que se induzca un número detectable de mutantes entre las bacterias trasplantadas. La estirpe SE101 presenta dos rasgos fenotípicos apropiados: Lac⁻ y Ara^S.

La exigencia de que las colonias trasplantadas a las cajas selectivas con nitrosoguanidina no presenten mutantes en ninguno de los dos sistemas, disminuye el "ruido genético" que pueda tener el método cuando se utiliza un solo marcador. En experimentos previos, utilizando la estirpe SV3 de *S. typhimurium* para la detección de estirpes inmutables, se obtuvieron bastantes colonias que no presentaban mutantes en las cajas con arabinosa, glicerina y nitrosoguanidina. Posteriormente se comprobó que la letalidad y frecuencia de auxótrofos inducidas por nitrosoguanidina en estas colonias eran iguales que en la estirpe original SV3. La incapacidad para producir mutantes Ara^R pudo deberse presumiblemente a algún defecto concreto en el sistema de utilización de la arabinosa.

En las estirpes seleccionadas como inmutables conviene estudiar la frecuencia de auxótrofos inducidos por nitrosoguanidina. Así se confirma su inmutabi-

lidad generalizada, ya que la auxotrofia cubre un amplio espectro de mutaciones posibles.

De las ocho estirpes seleccionadas en un principio como inmutables por nitrosoguanidina, sólo una tiene una frecuencia de auxótrofos significativamente más baja que la estirpe original. Las restantes estirpes presentan problemas de viabilidad o son muy sensibles a los efectos letales de la nitrosoguanidina. Una de las estirpes aisladas (la número 4 de las tablas II y IV) presenta presumiblemente un defecto específico en el operón *ara*.

El método empleado, además de las estirpes inmutables que buscamos, selecciona estas estirpes con comportamiento anómalo, ya que se detectará cualquier colonia que dé lugar a pocos mutantes en las cajas selectivas con nitrosoguanidina.

La estirpe SE43, aislada por tener una frecuencia de mutación con nitrosoguanidina significativamente menor que la estirpe original, resultó ser un doble mutante *inm recA*. El exigir que las colonias trasplantadas a las cajas selectivas con nitrosoguanidina no exhibiesen ningún mutante favoreció la elección de estirpes con problemas de viabilidad o reparación. Cada colonia de la estirpe original SE101 da lugar a 20-30 mutantes Ara^R ó Lac^+ en las cajas selectivas correspondientes. Las estirpes que bajasen la frecuencia de mutantes 5 ó 10 veces, sin presentar problemas de crecimiento adicionales, no fueron seleccionadas, ya que darían lugar a 2-6 colonias mutantes. De hecho, la estirpe SE53, que ya no presenta la mutación *recA* da lugar a algunos mutantes en las cajas selectivas.

Recientemente se han utilizado métodos semejantes al empleado en esta tesis para la obtención de estirpes inmutables por ultravioleta (Kato y Shinoura, 1977) y para la obtención de estirpes antimutadoras (Geiger y Speyer, 1977). En el primer caso, de 30.000 clones de una estirpe His⁻ mutagenizada con metanosulfonato de etilo, se obtuvieron seis que no revertían a His⁺ en cajas con 1 µg de óxido de nitroquinolina (agente mimético de la luz ultravioleta). Estos mutantes correspondían a los genes ya conocidos, *recA* y *lexA*, y a un nuevo gen, que se localiza en el minuto 25. En el segundo caso se seleccionaron clones con una frecuencia espontánea de mutación a resistencia a valina menor que en la estirpe original. De 1.500 clones termosensibles obtenidos con 2-aminopurina se obtuvo una estirpe antimutadora, localizada junto a *purB* y que baja significativamente la frecuencia de mutación espontánea y la inducida por varios agentes mutagénicos. Estos métodos, por tanto, permiten fácilmente el aislamiento de nuevas estirpes cuyos fenotipos son difícilmente seleccionables.

2. Características de las estirpes *inm*

Las estirpes *inm* no deben su fenotipo inmutable por nitrosoguanidina a una mutación en algún gen involucrado en la respuesta adaptativa de las células a daños producidos por agentes alquilantes (Samson y Cairns, 1977; Jeggo *et al.*, 1977). Un mutante constitutivo en este sistema de reparación sufriría, presumiblemente, menos mutaciones que la estirpe original. Hemos visto, sin embargo, que las estirpes *inm* responden normalmente a la adaptación por nitrosoguanidina

tanto a los efectos letales como mutagénicos, lo que elimina esta posibilidad.

La nitrosoguanidina y el metanosulfonato de etilo producen las mismas metilaciones en el ADN (Lawley, 1974) y dan lugar a las mismas sustituciones de bases (Coulondre y Miller, 1977). La existencia de estirpes *inm*, inmutables por nitrosoguanidina pero que responden normalmente al metanosulfonato de etilo, confirma la hipótesis de que el mecanismo de acción de estos dos agentes alquilantes es distinto.

El mecanismo de reparación de emergencia dependiente de los genes *recA* y *lexA*, responsable de todas las mutaciones inducidas por luz ultravioleta (Witkin, 1976), participa en la mutagénesis por nitrosoguanidina, ya que los mutantes *recA* y *lexA* presentan menores frecuencias de mutación inducidas por este mutágeno (Kondo *et al.*, 1970; Ishii y Kondo, 1975; Schendel *et al.*, 1978). La estirpe SE53 tiene un comportamiento normal frente a la luz ultravioleta, tanto en letalidad como en mutagénesis. La localización en el mapa de la mutación *inm* no coincide con la de *recA* ni *lexA*. El gen *inm* representa una función celular importante en la respuesta a nitrosoguanidina pero al parecer indiferente para la respuesta a ultravioleta.

Las estirpes *inm* presentan una frecuencia de mutación espontánea igual que las estirpes originales. La mutación *inm* no es, por tanto, una antimutadora generalizada. En bacterias se han descrito muy pocas mutaciones antimutadoras (Geiger y Speyer, 1977) y todas ellas, además de bajar la frecuencia de muta-

ción inducida por varios agentes químicos, presentan una frecuencia de mutación espontánea significativamente más baja.

La mutación *inm* cotransduce aproximadamente 40% con *xyl* (minuto 78.9) y menos del 10% con *pyrE* (minuto 80.8). Dado que el gen *mtl*, que cotransduce un 20% con *xyl* y un 10% con *pyrE* (Cronan y Bell, 1974), está situado en el minuto 79.6, suponemos que la mutación *inm* se encuentra aproximadamente en el minuto 79.5. (Todas las localizaciones se refieren al nuevo mapa genético de *E. coli* por Bachmann *et al.*, 1976).

Los genes situados en esa zona que guardan relación con replicación ó reparación son *sof* y *cou*, ambos en el minuto 81 y *recF* y *dnaA* en el minuto 82. Nuestros datos genéticos no permiten identificar a *inm* con ninguno de estos genes, sobre todo por la cotransducción de *inm* con *xyl*. Tampoco los fenotipos conocidos hasta ahora en los genes *sof*, *cou*, *recF* y *dnaA* tienen mucho que ver con el fenotipo del mutante *inm*.

Los mutantes *sof* ó *dnaS* se caracterizan por ser hiperrecombinogénicos y acumular transitoriamente fragmentos de ADN de 3S (Konrad y Lehman, 1975). Son defectivos en defosfohidrolasa del deoxiuridintrifosfato (dUTPasa), enzima que cataliza uno de los pasos en la conversión de dUTP a dTTP. Al bajar el nivel de dUTPasa, aumenta la incorporación de uracilo en el ADN recién sintetizado. La reparación por excisión elimina este uracilo, dando lugar a la acumulación de fragmentos cortos semejantes a los de Okazaki (Tye *et al.*, 1977).

El gen *cou* confiere resistencia a la coumermicina, un inhibidor de la síntesis replicativa del ADN en *E. coli* (Ryan, 1976), por afectar a la girasa del ADN, enzima que cataliza el superenrollamiento de éste. La girasa aislada de mutantes *cou* es resistente a coumermicina *in vitro*, por lo que se piensa que el gen *cou* especifica parte de la girasa (Gellert *et al.*, 1976). La otra parte sería debida al gen *nal*, que determina resistencia a nalidíxico (Suginó *et al.*, 1976). En experimentos no mostrados en la tesis la frecuencia de mutantes espontáneos resistentes a nalidíxico en SE43 fue la misma que en la estirpe original SE101. Estos derivados de SE43 resistentes a nalidíxico, que tienen una girasa anormal, continúan manifestando el fenotipo *inm*.

El gen *recF* controla una vía de recombinación que representa sólo el 1% de la recombinación total en células normales para la exonucleasa I. Las mutaciones *sbcB*, que hacen perder esta exonucleasa, incrementan notablemente la importancia de la vía de recombinación controlada por *recF*. El gen *recF* también es necesario para la inducción normal del profago λ por ciertos agentes químicos (Armengod y Blanco, 1978).

El gen *dnaA* está involucrado en la iniciación de la replicación del ADN. Todos los mutantes *dnaA* aislados son termosensibles (Hirota *et al.*, 1970; Wechsler y Gross, 1971).

Concluimos que *inm* no es un nuevo alelo de alguno de estos genes sino que identifica un gen hasta ahora desconocido.

3. Efecto de la nitrosoguanidina sobre el ADN de *E. coli*

Para estudiar el efecto de la nitrosoguanidina sobre el tamaño del ADN de *E. coli*, ha sido necesario desarrollar un método de extracción suave, que permitiese obtener el ADN lo más puro y lo menos fraccionado posible. El componente de 73 megadáltones obtenido en gradiente de sacarosa de ADN nativo de *E. coli* indica un aislamiento suficientemente suave y la contaminación de proteínas es inapreciable.

La curva de disociación del ADN de células tratadas con nitrosoguanidina indica una población heterogénea respecto al tamaño de los fragmentos de ADN. Los datos de la centrifugación en gradiente de sacarosa confirman la rotura del ADN de células tratadas con nitrosoguanidina en fragmentos de distintos pesos moleculares.

Esta fragmentación del ADN se debe presumiblemente a una mayor sensibilidad a la rotura en el proceso de extracción, al existir incisiones producidas por el mecanismo de reparación en una de las dos cadenas.

Los datos de incorporación de radioactividad en ADN de células tratadas con nitrosoguanidina marcada en el grupo metilo, sugieren que esta reparación no elimina significativamente las metilaciones, al menos en las tres horas siguientes al tratamiento. Esto está de acuerdo con los resultados de Lawley y Orr (1970) que no detectan excisión de ^7N -metilguanina del ADN de *E. coli* tratada con nitrosoguanidina. La

⁷N-metilguanina es el producto metilado que se forma en mayor cantidad (67%) tras el tratamiento con nitrosoguanidina en tanto que la ⁶O-metilguanina que tiene una vida media en el ADN de menos de 1 hora (Lawley y Orr, 1970) sólo representa el 7% de la metilación total (Strauss *et al.*, 1975).

Las metilaciones afectan a todo el ADN, y no especialmente al ADN de la zona de replicación (Scudiero y Strauss, 1976). Sin embargo, la nitrosoguanidina estimula la reparación (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967a) preferentemente en la zona de replicación (Scudiero y Strauss, 1976). Esto hace pensar que las metilaciones no constituyen el blanco principal de la reparación inducida por nitrosoguanidina en la zona de replicación, sino que existe otro tipo de daño relacionado con esta zona que es el mayoritariamente reparado.

4. Mecanismo de acción de la nitrosoguanidina

Los numerosos resultados acumulados hasta ahora sobre mutagénesis por nitrosoguanidina nos permiten asegurar que su mecanismo de acción es muy complejo, ya que intervienen varias acciones químicas directas y las maquinarias de replicación y reparación de la célula. De los datos obtenidos con las estirpes *inm*, se puede deducir que hay una vía mayoritaria de mutación, que está bloqueada en estas estirpes. La mutación residual observada en las estirpes *inm* podría deberse a otras vías distintas, posiblemente resultado de la modificación química directa del ADN por el mutágeno.

Los principales resultados relevantes para la mayoría de las mutaciones inducidas por nitrosoguanidina son los siguientes:

1. *Acción química directa.* La nitrosoguanidina reacciona escasamente con el ADN, metilándolo; las metilaciones no se encuentran especialmente en la zona en replicación; la nitrosoguanidina reacciona con las proteínas.

2. *Relación con la replicación.* Las mutaciones se producen cerca del punto de replicación; se encuentran muchas mutaciones múltiples muy próximas (comutación); se requiere replicación del ADN en la célula tratada para que se produzcan mutaciones.

3. *Relación con la reparación.* La mayoría de las mutaciones que afectan a la reparación no afectan a la frecuencia de mutación inducida por nitrosoguanidina; los mutantes *recA* y *lexA*, defectuosos en el sistema de reparación de emergencia, son menos mutagenizables por nitrosoguanidina; la reparación es particularmente activa en la zona de replicación.

4. *Relación con otros mutágenos.* La mutación *inm* no afecta a la mutagénesis espontánea, ni por metanosulfonato de etilo, ni por ultravioleta, ni al sistema de reparación especial inducido por agentes alquilantes.

Una hipótesis que intenta explicar unitariamente estos resultados sería la siguiente:

El gen inm determina un componente, hasta ahora desconocido, de la maquinaria de replicación. Su producto normal, $p(inm)$, al volver a iniciarse la replicación tras la acción de la nitrosoguanidina, causa numerosos errores. Este comportamiento de $p(inm)$ podría ser suscitado por las alteraciones del ADN debidas al mutágeno o por la modificación de $p(inm)$ directamente por el mutágeno.

Los numerosos errores son reparados por varios sistemas de reparación distintos, incluyendo el sistema de reparación de emergencia dependiente de $recA$ y $lexA$.

Las mutaciones se deben a errores no letales no corregidos por ningún sistema de reparación o a errores, letales o no, defectuosamente corregidos por el sistema de reparación de emergencia, notorio por su escasa fidelidad.

El comportamiento anormal de $p(inm)$ es inducido por la nitrosoguanidina y por algunos compuestos muy semejantes, pero no por todos los compuestos alquilantes, ni por la radiación ultravioleta, ni se produce espontáneamente.

Un elemento importante de esta hipótesis, la participación de la maquinaria de replicación en la inducción de mutaciones, está bien documentado. En el fago T4 se han obtenido estirpes mutadoras y antimutadoras que presentan una frecuencia de mutación espontánea e inducida por agentes químicos mayor o menor, respectivamente, que las estirpes silvestres (Drake y Allen,

1968; Drake y Greening, 1970; Drake, 1973). Algunas de estas estirpes de T4 son mutantes en el gen 43, responsable de la polimerasa del ADN del fago (Allen *et al.*, 1970). Estudios bioquímicos de las polimerasas de las estirpes antimutadoras han demostrado que su relación de actividades exonucleasa/polimerasa es más alta que en la estirpe silvestre (Muzyczka *et al.*, 1972; Schnarr *et al.*, 1973).

En bacterias también se ha descrito una relación entre mutación espontánea y polimerasa III (Hall y Brammar, 1973). Dos mutantes *polC* sensibles a la temperatura, presentan una tasa de mutación espontánea a temperaturas permisivas mayor que la estirpe silvestre. Los revertientes no termosensibles espontáneos tienen una tasa de mutación normal, indicando que ambos fenotipos van asociados. Esto sugiere que la polimerasa III del ADN participa en la selección de bases durante la replicación. Recientemente se ha propuesto también la participación de la polimerasa III en la mutagénesis por ultravioleta (Bridges *et al.*, 1976; Villani *et al.*, 1978).

Se ha estudiado si la polimerasa III tratada con nitrosoguanidina da lugar a la incorporación de bases erróneas en un sistema de síntesis de ADN *in vitro*. La frecuencia de errores, muy alta incluso con polimerasa III no tratada, no aumentó tras el tratamiento de la polimerasa con nitrosoguanidina, pero se apreció una inactivación progresiva de la enzima, lo que podría explicar que la nitrosoguanidina pare la replicación *in vivo* (Jiménez Sánchez, 1976). El gen

inm, en todo caso, no puede confundirse con ninguno de los genes *pol*, responsables de las polimerasas del ADN. Queda, sin embargo la posibilidad de que sea otro componente de la compleja maquinaria de replicación el blanco de la acción mutagénica de la nitrosoguanidina y que la actuación de esa maquinaria replicadora defectiva sea la causa de las mutaciones.

BIBLIOGRAFIA

- ADELBERG, E.A., MANDEL, M. y CHEN, G.C.C. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18, p. 788.
- ALLEN, E.F., ALBRECHT, I. y DRAKE, J.W. (1970) *Genetics*, 65, p. 187.
- ARMENGOD, M.E. y BLANCO, M. (1978) *Mutat. Res.*, 52, p.37.
- ASATO, Y. y FOLSOME, C.E. (1970) *Genetics*, 65, p. 407.
- BACHMANN, B.J., LOW, K.B. y TAYLOR, A.L. (1976) *Bacteriol. Rev.*, 40, p.116.
- BEATTIE, K.L. (1975) *Mutat. Res.*, 27, p. 201.
- BEATTIE, K.L. y KIMBALL, R.F. (1974) *Mutat. Res.*, 24, p. 105.
- BOOKER, R.J. y LOUITIT, J.S. (1975) *Genet. Res.*, 25, p.215.
- BOYER, H., ENGLESBERG, E. y WEINBERG, R. (1962) *Genetics*, 47, p. 417.
- BRIDGES, B.A., MOTTERSHEAD, R.P. y SEDGWICK, S.G. (1976) *Mol. Gen. Genet.*, 144, p. 53.
- BURKE, W. y FANGMAN, W.L. (1975) *Cell*, 5, p. 263.
- CERDA OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1967a) *Mutat. Res.*, 4, p. 369.
- CERDA OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1967b) *Biochim. Biophys. Acta*, 142, p. 450.
- CERDA OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1968) *Mol. Gen. Genet.*, 101, p. 191.

- CERDA OLMEDO, E., HANAWALT, P.C. y GUEROLA, N. (1968) *J. Mol. Biol.*, *33*, p. 705.
- COHN, W. y CRAWFORD, I.P. (1976) *J. Bacteriol.*, *127*, p. 367.
- CORRAN, J. (1971) *Fol. Microbiol.*, *16*, p. 149.
- COULONDRE, C. y MILLER, J.H. (1977) *J. Mol. Biol.*, *117*, p. 577.
- CRADDOCK, V.M. (1969) *Biochem. J.*, *111*, p. 615.
- CRONAN, J.E., Jr. y BELL, R.M. (1974) *J. Bacteriol.*, *118*, p. 598.
- CURTISS, R. y RENSHAW, J. (1969) *Genetics*, *63*, p. 7.
- DAWES, I.W. y CARTER, B.L.A. (1974) *Nature*, *250*, p. 709.
- DAWES, I.W., MACKINNON, D.A., BALL, D.E., HARDIE, I.D., SWEET, D.M., ROSS, F.M. y MACDONALD, F. (1977) *Mol. Gen. Genet.*, *152*, p. 53.
- DEGNEN, G.E. y COX, E.C. (1974) *J. Bacteriol.*, *117*, p. 477.
- DELANEY, S.F. y CARR, N.G. (1975) *J. Gen. Microbiol.*, *88*, p. 259.
- DRAKE, J.W. (1973) *Genetics*, *73* (Supl.), p. 45.
- DRAKE, J.W. y ALLEN, E.F. (1968) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, *33*, p. 339.
- DRAKE, J.W. y GREENING, E.O. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *66*, p. 823.

DUGLE, D.L., CAMPBELL, C.E., MEEKEK, B.E. y GILLESPIE, C.J. (1973) *Mutat. Res.*, 18, p. 237.

EDLUND, T. , GUSTAFSSON, P. y WOLF-WATZ, H. (1976) *J. Mol. Biol.*, 108, p. 295.

EISENSTARK, A. (1967) *Nature*, 213, p.1263.

EISENSTARK, A., EISENSTARK, R. y SICKLE, R.V. (1965) *Mutat. Res.*, 2, p. 1.

ENGLESBERG, R.L. y ANDERSON, R. (1962) *J. Bacteriol.*, 84, p. 137.

ENGLESBERG, E., SQUIRES, C. y MERONK, F. Jr. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 62, p. 1.100.

GEIGER, J.R. y SPEYER, J.F. (1977) *Molec. Gen. Genet.*, 153, p. 87.

GELLERT, M., O'DEA, M.H., ITOH, T. y TOMIZAWA, J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, p. 4474.

GIELOW, L., LARGEN, M. y ENGLESBERG, E. (1971) *Genetics*, 69, p. 289.

GLICKMAN, B.W., VAN den ELSEN, P. y RADMAN, M. (1978) *Molec. Gen. Genet.*, 63, p. 307.

GODFREY, O.W. (1974) *Can. J. Microbiol.*, 20, p. 1479.

GOMORI, G. (1955) *Methods in Enzymology*, Acad. Press (New York), vol. I, p. 138-146.

GUEROLA, N. y CERDA OLMEDO, E. (1975) *Mutat. Res.* 29, p. 145.

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

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

HALL, R.M. y BRAMMAR, W.J. (1973) *Molec. Gen. Genet.*, 121, p. 271.

HANAWALT, P.C. (1963) *Nature*, 198, p. 286.

HILLMAN, J.D. y FRAENKEL, D.G. (1975) *J. Bacteriol.*, 122, p. 1175.

HINCE, T.A. y NEALE, S. (1974) *Mutat. Res.*, 24, p. 383.

HINCE, T.A. y NEALE, S. (1977) *Mutat. Res.*, 43, p. 11.

HIROTA, Y., MORDOH, J. y JACOB, F. (1970) *J. Mol. Biol.*, 53, p. 369.

HOHLFELD, R. y VIELMETTER, W. (1973) *Nature*, 242, p. 130.

ISHII, Y. y KONDO, S. (1975) *Mutat. Res.*, 27, p. 27.

JEGGO, P., DEFAIS, M., SAMSON, L. y SCHENDEL, P. (1977) *Molec. Gen. Genet.*, 157, p. 1.

JEGGO, P., DEFAIS, M., SAMSON, L. y SCHENDEL, P. (1978) *Molec. Gen. Genet.*, 162, p. 299.

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

JIMENEZ SANCHEZ, A. (1976) *Molec. Gen. Genet.*, 145, p. 113.

- JIMENEZ SANCHEZ, A. y CERDA OLMEDO, E. (1975) *Mutat. Res.*, 28, p. 337.
- JYSSUM, K. (1969) *J. Bacteriol.*, 99, p. 757.
- KASAHARA, H., UDAKA, S. y IKED, Y. (1971) *Agr. Biol. Chem.*, 35, p. 226.
- KATO, T. y SHINOURA, Y. (1977) *Molec. Gen. Genet.*, 156, p. 121.
- KIMBALL, R.F. y SETLOW, J.K. (1974) *Mutat. Res.*, 22, p.1.
- KIRTIKAR, D.M. y GOLDTHWAIT, D.A. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, p. 2022.
- KOIKE, K., KOBAYASHI, M., FUJISAWA, T. y TANAKA, S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 402, p. 351.
- KONDO, S. (1973) *Genetics Suppl.* p. 109.
- KONDO, S. e ICHIKAWA, H. (1973) *Molec. Gen. Genet.*, 126, p. 319.
- KONDO, S., ICHIKAWA, H., IWO, K. y KATO, T. (1970) *Genetics*, 66, p. 187.
- KONICKOVA-RADOCHOVA, M. y KONICEK, J. (1974) *Folia Microbiol.*, 19, p. 16.
- KONICKOVA-RADOCHOVA, M. y KONICEK, J. (1976) *Folia Microbiol.*, 21, p. 10.
- KONRAD, E.B. y LEHMAN, I.R. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, p. 2150.

- KOSHINUMA, K., IWAHARA, S., KAMIYA, S., NAKADATE, M. y SUZUKI, I. (1970) Bull. Natl. Inst. Hyg. Sci., Tokyo, 88, p. 118.
- KOYAMA, A.H., WADA, C., NAGATA, T. y YURA, T. (1975) J. Bacteriol., 122, p. 73.
- KUNICKI-GOLDFINGER, W.J. y MYCIELSKI, R. (1966) Acta Microbiol. Polon., 15, p. 113.
- LANGRIDGE, J. y CAMPBELL, J.M. (1969) Molec. Gen. Genet., 103, p. 339.
- LA POLLA, J.P., HARRIS, C.M. y VARY, J.C. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., 49, p. 133.
- LAWLEY, P.D. (1974) Mutat. Res., 23, p. 283.
- LAWLEY, P.D. (1975) Molecular Mechanisms for Repair of DNA, p. 25-28, Hanawalt P.C. y Setlow, R.B., Plenum Press, New York.
- LAWLEY, P.D. y ORR, D.J. (1970) Chem. Biol. Interact., 2, p. 154.
- LAWLEY, P.D. y THATCHER, C.J. (1970) Biochem. J., 116, p. 693.
- LAWLEY, P.D., ORR, D.J., SHAL, S.A., FARMER, P.B. y JARMAN, M. (1973) Biochem. J., 135, p. 193.
- LEDERBERG, E.M. y LEDERBERG, J. (1953) Genetics, 38, p. 51.
- LEE, R.W. y JONES, R.F. (1973) Molec. Gen. Genet., 121, p. 99.

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

LOVELESS, A. (1969) Nature, 223, p. 206.

LOW, B. y WOOD, T.H. (1965) Genet. Res., 6, p. 300.

LLOVERES, C.P. y CERDA OLMEDO, E. (1973) J. Bacteriol., 116, p. 527.

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

MARINUS, M.G. (1973) Molec. Gen. Genet., 127, p. 47.

MCCALLA, D.R. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 155, p.114.

MCCALLA, D.R. y REUVERS, A. (1968) Can. J. Biochem., 46, p. 1411.

MCCALLA, D.R., REUVERS, A. y KITAI, R. (1968) Can. J. Biochem. Physiol., 46, p. 807.

Mc KAY, A.F. (1948) J. Am. Chem. Soc., 70, p. 1974.

Mc KAY, A.F. (1949) J. Am. Chem. Soc., 71, p. 1968.

Mc KAY, A.F. y WRIGHT, G.F. (1947) J. Am. Chem. Soc., 69, p. 3028.

MISHANKIN, B.N., SUCHKOV, Yu.G., BOGDANOVA, M.I., KOLTZOVA, E.G. y RYZHKOV, V.Yu. (1973) Genetika, 9, p. 135.

- MIYAKI, M., SAI, G., KATAGIRI, S., AKAMATSU, N. y ONO, T. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, p. 136.
- MUZYCZKA, N., POLAND, R.L. y BESSMAN, H.J. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, p. 7116.
- NAGAO, M., YOKOSIMA, T., HOSOI, H. y SUGIMURA, T. (1969) *Biochem. Biophys. Acta*, 192, p. 191.
- NEALE, S. (1976) *Mutat. Res.*, 32, p. 229.
- NESTMANN, E.R. (1975) *Mutat. Res.*, 28, p. 323.
- NEWTON, A. , MASYS, D., LEONARDI, E. y WYGAL, D. (1972) *Nature, New Biol.*, 236, p. 19.
- OESCHGER, M.P. y BERLYN, M.K.B. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, p. 911.
- OESCHGER, N.S. y HARTMAN, P.E. (1970) *J. Bacteriol.*, 101, p. 490.
- OLSON, A.O. y BAIRD, K.M. (1969) *Biochem. Biophys. Acta*, 179, p. 513.
- ORGEL, L.E. (1965) *Adv. Enzym.*, 27, p. 289.
- PRAKASH, L. y SHERMAN, F. (1973) *J. Mol. Biol.*, 79, p. 65.
- RANDAZZO, R., SCIANDRELLO, G., CARERE, A., BIGNAMI, M., VELCICH, A. y SERMONTI, G. (1976) *Mutat. Res.*, 36, p. 291.
- RUIZ VAZQUEZ, R., PUEYO, C. y CERDA OLMEDO, E. (1978) *Mutat. Res.*, 54, p. 121.
- RYAN, M.J. (1976) *Biochemistry*, 15, p. 3769.

- RYAN, F.J. y CETRULLO, S.D. (1963) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *12*, p. 445.
- SALGANIK, R.I. (1972) *Biol. Zbl.*, *91*, p. 49.
- SAMSON, L. y CAIRNS, J. (1977) *Nature*, *267*, p. 281.
- SCHENDEL, P.F., DEFAIS, M., JEGGO, P., SAMSON, L. y CAIRNS, J. (1978) *J. Bacteriol.*, *135*, p. 466.
- SCHNAAR, R.L., MUZYCZKA, N. y BESSMAN, M.J. (1973) *Genetics*, *73* (Suppl.), p. 137.
- SCHWARTZ, M. y WORCEL, A. (1971) *J. Mol. Biol.*, *61*, p. 329.
- SCUDIERO, D. y STRAUSS, B. (1976) *Mutat. Res.*, *35*, p. 311.
- SICCARDI, A.G., FERRARI, F.A., MAZZA, G. y GALIZZI, A. (1976) *J. Bacteriol.*, *125*, p. 755.
- SIEGEL, E.C. y IVERS, J.J. (1975) *J. Bacteriol.*, *121*, p. 524.
- SINGER, B. (1975) *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, *15*, p. 219.
- SINGER, B. y FRAENKEL-CONRAT, H. (1969) *Biochemistry*, *8*, p. 3266.
- SINGER, B., FRAENKEL-CONRAT, H., GREENBERG, J. y MICHELSON, A.M. (1968) *Science*, *160*, p. 1235.
- STRAUSS, B., SCUDIERO, D. y HENDERSON, E. (1975) *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, p. 13-24, Hanawalt, P.C. y Setlow, R.B., Plenum Press, New York.

- SUGIMURA, T., FUJIMURA, S., NAGAO, M., YOKOSHIMA, T. y HASEGAWA, M. (1968) *Biochem. Biophys. Acta*, 170, p. 427.
- SUGINO, A., PEEBLES, C.L., KRENZER, K.N. y COZZARELLI, N.R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, p. 4767.
- SWEET, D.M. y MOSELEY, B.E.B. (1974) *Mutat. Res.*, 23, p. 311.
- SWEET, D.M. y MOSELEY, B.E.B. (1976) *Mutat. Res.*, 34, p. 175.
- TYE, B.K., NYMAN, P.O., LEHMAN, I.R., HOCHHAUSER, S. y WEISS, B. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, p. 154.
- VIKHANSKII, Yu.D. y ZHDANOVA, N.I. (1976) *Genetika*, 12, p. 139.
- VILLANI, G., BOITEUX, S. y RADMAN, M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, p. 3037.
- VINOPAL, R.T., CLIFTON, D., y FRAENKEL, D.G. (1975) *J. Bacteriol.*, 122, p. 1162.
- WARD, C.B. y GLASER, D.A. (1969a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 62, p. 881.
- WARD, C.B. y GLASER, D.A. (1969b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63, p. 800.
- WARD, C.B. y GLASER, D.A. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, p. 255.
- WEBB, S.J. y TAI, C.C. (1970) *Photochem. Photobiol.*, 12, p. 119.
- WECHSLER, J.A. y GROSS, J.D. (1971) *Molec. Gen. Genet.*, 113, p. 273.

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

WITKIN, E.M. (1976) Bacteriol. Rev., 40, p. 869.

YAMAMOTO, K., KONDO, S. y SUGIMURA, T. (1978) J. Mol. Biol., 118, p. 413.

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

YOURNO, J., BARR, D. y TANEMURA, S. (1969) J. Bacteriol., 100, p. 453.

ZUBAY, G., SCHWARTZ, D. y BECKWITH, J. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, p. 104.

AGRADECIMIENTOS

Al Director de esta tesis, Prof. Enrique Cerdá Olmedo, a todos mis compañeros de trabajo, especialmente a las Isabeles y a Reyes, que compartieron mis momentos buenos y malos en el laboratorio, ayudándome siempre con su amistad. A Asunción Fernández por su constante ayuda técnica, y a Maribel Carretero por haber mecanografiado este trabajo. Muy especialmente a Santiago.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

ROSA MARIA RUIZ VAZQUEZ

titulada "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
ESTIRPE DE ESCHERICHIA COLI INMUTABLE POR
NITROSOGUANIDINA".

Se acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente
"cum laude".

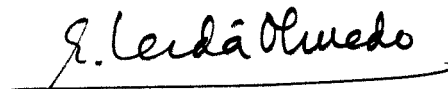
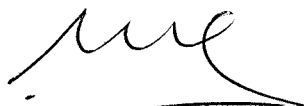
Sevilla, 19 de ENERO

1979

El Vocal

El Vocal.

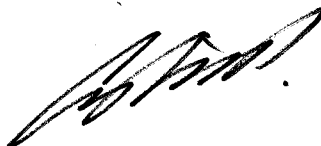
El Vocal.



Presidente.

El Secretario.

El Doctor.



Rosa María Ruiz