

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE UNA NUEVA MUTANTE DEL GENE pyr A DE E. coli K-12,
PRODUCIDA POR LISOGENIA POR EL BACTERIOFAGO Mu-1.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A .

MATILDE GALVAN GARCIA

MEXICO, D. F. 1973

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS TESIS 1973
ADQ M.C. 40106
FECHA _____
PREC _____



QUIMICA

JURADO ASIGNADO :

PRESIDENTE : OSCAR AMOR DODERO
VOCAL : JOSE DE JESUS MANRIQUE
SECRETARIO : FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA
1er. SUPLENTE : EDMUNDO CHAVEZ COSIO
2o. SUPLENTE : ANA MARIA GUTIERREZ ARCOS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, U.N.A.M.

SUSTENTANTE

MATILDE GALVAN GARCIA

ASESOR DEL TEMA:

FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA

INDICE GENERAL

Págs.

INTRODUCCION:

Motivos del trabajo	4
Introducción	7

MATERIALES Y METODOS:

Materiales	17
Métodos	20
RESULTADOS	28

DISCUSION Y CONCLUSIONES:

Discusión	51
Conclusiones	57

<u>GLOSARIO</u>	60
-----------------------	----

<u>BIBLIOGRAFIA</u>	62
---------------------------	----

MOTIVOS DEL TRABAJO

Durante la búsqueda de mutantes autotrofos de arginina producidas en cepas de E. coli K-12, por la inserción del cromosoma del bacteriofago Mu-1 (19,27) en el genoma de la bacteria, se encontró una cepa incapaz de crecer en ornitina como fuente de arginina, pero sí en citrulina (Fig.6).

De acuerdo con las características fenotípicas de esta célula, se pensó que ésta pudiera ser una mutante de E. coli K-12, que careciera de la actividad enzimática de ornitino transcarbamilasa (OTC) (Fig. 2), fenómeno no reportado en E. coli K-12, ya que hoy se sabe que este organismo tiene dos genes que codifican para la OTC (Fig. 1), arg F y arg T, que mapean en los minutos 7 y 78 respectivamente y por ende, este sería el primer caso en el cual, en un solo paso, se obtuvieran mutantes OTC⁻.

Teniendo en mente esta idea, se pensó en medir la actividad específica de la OTC de la cepa mutante y compararla con la de la cepa progenitora. En caso de resultar semejantes, esto nos hablaría de la posibilidad de que la mutación estuviera a nivel de carbamil fosfato sintetasa (CPS) (Fig. 2), tomando en cuenta las características fenotípicas de la cepa mutante.

La importancia de que se tratara de una mutante CPS⁻ radica en el hecho de que una mutación al nivel del gene pyr A, el cual codifica para la CPS (Fig. 2), tendría como consecuencia que no se sintetizara carbamil fosfato, y, siendo éste un precursor común de las vías metabólicas de biosíntesis de arginina y pirimidinas, este hecho resultaría en un fenotipo que requiriera uracilo y arginina para crecer. Sin embargo, este no es el caso, ya que la mutante no necesita uracilo para crecer y sí arginina, aunque en presencia de la pirimidina, crece mejor. (Fig. 6).

Ahora bien, los datos anteriores nos hicieron pensar en la posibilidad de tener una mutante del gene pyr A, "diferente", por lo menos -

fenotípicamente, de las reportadas anteriormente en *E. coli* K-12 (1,2).

De acuerdo con esta idea, se planeó la realización de los experimentos descritos en el presente trabajo, con el fin de caracterizar lo que pensamos es un nuevo fenotipo del gene *pyr A* de *E. coli* K-12.

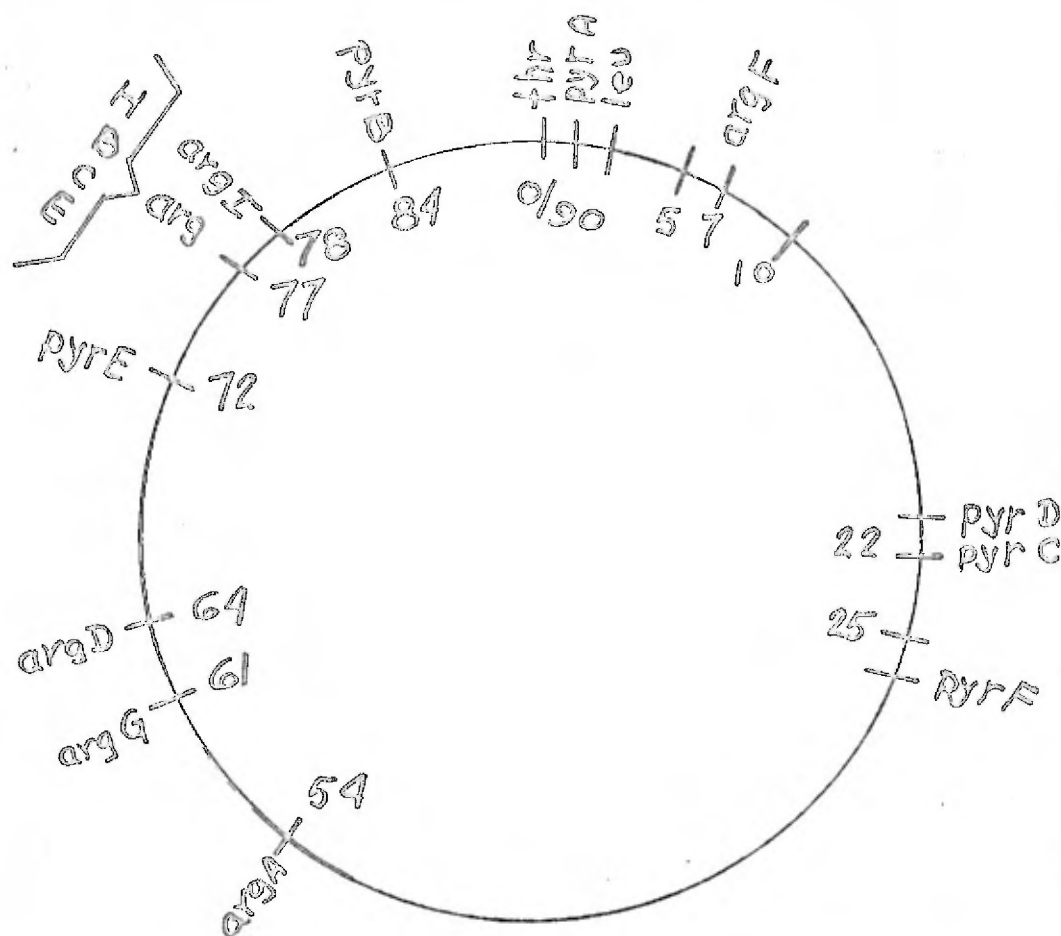


Fig. No. 1 .- Posición en el cromosoma de *E. coli* de los genes que codifican para las enzimas de las vías metabólicas de la biosíntesis de arginina y pirimidinas (28).

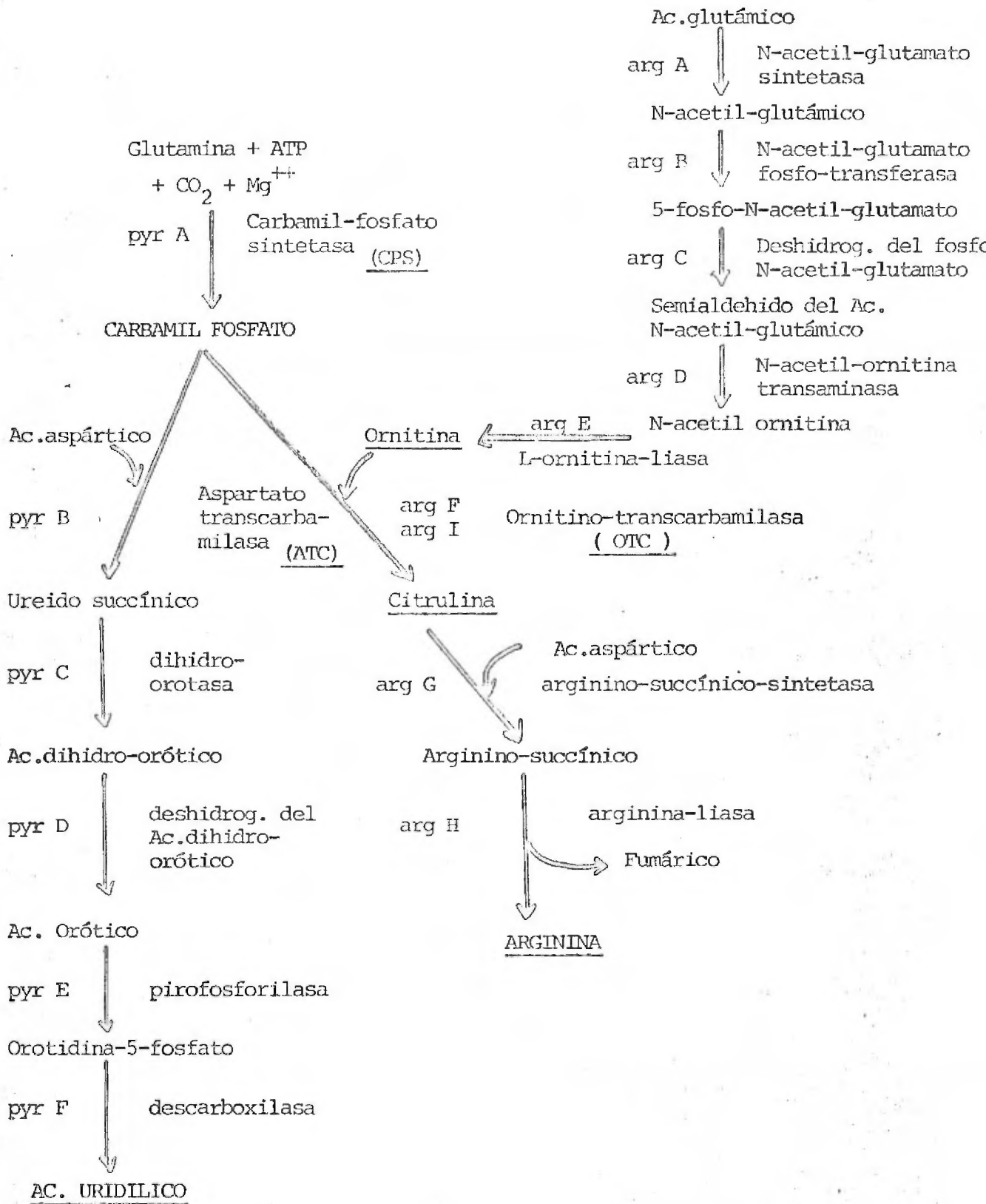


Fig. Num. 2.- Vía metabólica para la biosíntesis de arginina y pirimidinas en E. coli.

INTRODUCCION

Los bacteriofagos, como su nombre lo indica, son virus que infectan a las bacterias, y, según el tipo de relación que mantengan con ellas, puede hablarse de dos clases de fagos: los bacteriofagos "temperados" y los bacteriofagos "líticos" (18).

Los fagos temperados se caracterizan porque pueden vivir dentro de la bacteria sin ocasionar la lisis de ésta, es decir, cuando una bacteria contiene el material genético de un fago temperado, se dice que la bacteria es lisogénica para dicho fago; estas bacterias crecen normalmente, pero en sus cultivos siempre se libera fago, aunque su salida no ocurre por excreción, sino por una lisis ocasional del huésped, variando la frecuencia de esta lisis en cultivos lisogénicos, desde 1:1 000 hasta 1:10⁶. Un fago temperado debe ser detectado y debe ensayarse su acción lítica sobre una cepa sensible, o sea, sobre una cepa de bacterias no lisogénicas para este fago.

En la mayoría de las células de una colonia de bacterias lisogénicas, no se encuentran "viriones" adultos ni proteínas virales y únicamente se localizan en la fracción de células que, espontáneamente ó por inducción, han dejado de ser lisogénicas, con la subsecuente formación de una población de fagos.

~~Esto nos hace preguntarnos en qué parte de la bacteria lisogénica se encuentra localizado el profago temperado.~~

En E. coli se ha logrado comprobar la asociación física entre algunos profagos y el cromosoma de la bacteria, gracias a experimentos de conjugación bacteriana, y se ha demostrado que se encuentran, en algunos casos, insertados en el cromosoma (18).

De acuerdo con esto, se puede considerar el profago como un marcador genético y puede ser mapeado en el cromosoma de la bacteria, debido a la

unión específica que lleva a efecto con otros marcadores.

Muchos fagos temperados tienen únicamente un sitio de inserción en el cromosoma de la bacteria huésped, siendo éste el caso del profago λ . Hay otros que tienen un número variado, como en el caso del fago P_2 que tiene nueve, a diferencia de $Mu-1$ que tiene un número indeterminado de sitios de inserción (19).

Esta inserción del profago en el cromosoma bacteriano ocurre por un mecanismo que ha sido propuesto por Campbell (10), el cual dice que inmediatamente después de que la molécula de DNA fágico entra en la célula, se circulariza y este círculo se asocia con el cromosoma en la región donde se insertará posteriormente. Se produce un entrecruzamiento y esto da lugar a la inserción del profago en el cromosoma de la bacteria. Se regresa a la secuencia vegetativa por el proceso inverso ó proceso de escisión.

Se han mencionado con anterioridad los términos "profago" y "estado vegetativo", los cuales procederemos a explicar.

En el momento en que un bacteriofago temperado infecta una célula bacteriana, le inyecta su material genético y éste puede seguir dos alternativas dentro de la célula huésped:

a) El estado vegetativo, en el cual el genoma fágico se multiplica autónomamente, sintetizándose durante el proceso, partículas fágicas infecciosas que son liberadas por la lisis de algunas células huésped.

b) El estado de profago, en el cual el material genético del fago se inserta en el cromosoma de la bacteria, en sitios específicos ó no dependiendo del bacteriofago, de tal forma que ambos elementos genéticos se replican como una sola unidad.

Mientras que el profago permanezca integrado, no se producen partículas fágicas y la célula se replica para dar lugar a una colonia lisogénica. Para que una bacteria lisogénica pueda producir partículas fágicas, el ma-

terial genético del fago debe escindirse del cromosoma bacteriano y pasar al estado vegetativo.

Inmunidad específica

Las bacterias lisogénicas tienen la propiedad de ser específicamente inmunes a aquellos bacteriofagos cuyos sus genomas, en estado de profago, estén ya presentes en el interior de la célula. Cuando células lisogénicas son infectadas por fagos homólogos, ocurre que estos fagos inyectan su DNA, pero éste no se expresa, permaneciendo inerte y siendo diluido conforme la replicación celular continúa (15). Cuando el profago se pierde, las bacterias se vuelven sensibles nuevamente.

Inducción cigótica

Cuando una bacteria lisogénica transmite parte de su DNA, en el cual va insertado el profago, a una bacteria no lisogénica para el mismo fago, el receptor, después de un tiempo, se lisa. A este fenómeno se le llama inducción cigótica (15). Cuando el donador es no lisogénico y el receptor es lisogénico, no ocurre la inducción cigótica.

Transducción y contrasducción

El fenómeno de transducción fue descubierto en 1952 por Zinder y Lederberg (30), quienes observaron que el fago temperado PLT22 de Salmonella typhimurium, era capaz de transferir marcadores genéticos entre diferentes cepas bacterianas. Como ejemplo, digamos que el fago se propaga en una cepa bacteriana prototrofa, o sea, en un tipo de bacteria capaz de crecer en un medio mínimo, y este fago se pone en contacto después con una cepa mutante que requiera algún aminoácido para crecer, como arginina, este contacto es capaz de convertir una pequeña parte del cultivo de célu-

las auxotrofas de arginina, en arginina independientes.

Este fenómeno es una propiedad que tienen muchos fagos temperados de diferentes tipos de bacterias como bacilos, pseudomonas, micobacterias, etc.

El material genético transferido por el fago transductante es un fragmento del genoma bacteriano. Las frecuencias de transducción de cualquier marcador, son comparables para cualquier tipo de fago. Cuando dos o más genes se encuentran separados por una distancia DNA menor que el tamaño máximo que puede ser transferido por un determinado fago transductante, estos marcadores pueden ser contrasducidos. Mientras más alejados se encuentren, menos será la frecuencia de contrasducción.

El fago P_1 puede transducir un segmento del cromosoma bacteriano -- hasta del 2% del genoma bacteriano, o sea aproximadamente 58 millones de peso molecular en material genético (14). El fago P_1 puede transducir también el profago de algún otro fago como λ y Mu-1

Por lo que respecta al mecanismo de transducción, puede plantearse el siguiente:

El fago P_1 infecta a la célula e inyecta su DNA. Una vez dentro de la célula, el DNA del fago da lugar al rompimiento del cromosoma bacteriano en fracciones diferentes en tamaño, algunas de las cuales serán aproximadamente del mismo peso y tamaño del DNA fágico. A la par que se rompe el DNA bacteriano, se replica el DNA del fago y se inicia también la síntesis de proteínas virales. Ocurre el ensamble de los viriones y puede ser que también se ensambelen fracciones de DNA bacteriano del mismo peso del viral como si fueran DNA fágico. Cuando la bacteria se lisa, entre las partículas fágicas se tienen algunas que sólo llevan en su cabeza DNA bacteriano, las cuales pueden introducirse en una célula, y una vez dentro puede efectuarse una recombinación de este material genético y dar lugar a

células con diferentes características feno y genotípicas.

El bacteriofago Mu-1

Muchos de los rasgos o caracteres hereditarios de una bacteria están determinados por una clase especial de elementos genéticos llamados episomas. Algunos elementos episómicos, por ejemplo: fagos transductantes y el factor sexual de E. coli K-12, ayudan a la transferencia intercelular de los genes bacterianos. Se supone que los episomas pueden también regular las actividades biosintéticas de las bacterias, a nivel genético, estimulando, inhibiendo ó modificando la expresión fenotípica de genes específicos.

En 1963, A.L. Taylor (27) descubre accidentalmente al bacteriofago temperado Mu-1, al efectuar pruebas de lisogenia en una cepa de E. coli que había sido expuesta al fago P_1 . El caldo con cloroformo de un cultivo de esta cepa, fue sembrado en placas indicadoras de Shigella dysenteriae para titular fagos P_1 libres. Al hacerlo, algunas de las placas que aparecieron después de la incubación presentaban características morfológicas diferentes a las del fago P_1 . Los fagos tomados de una de las placas, infectaban con igual eficiencia cepas P_1 lisogénicas y no lisogénicas; más aún, el antisuero preparado contra P_1 no inactivaba este fago, por lo que se deduce que el fago Mu-1 no está relacionado con el fago P_1 .

El bacteriofago Mu-1 provoca severas modificaciones genéticas en su huésped habitual E. coli K-12, Su profago suprime la expresión fenotípica de muchos de los genes huéspedes localizados en ó cerca del sitio donde se integra el fago en el cromosoma de E. coli. El efecto principal del fago Mu-1 no es seleccionar para mutantes espontáneas, sino inducir nuevas mutantes en bacterias infectadas, es decir, el fago Mu-1 es el mutágeno activo y la mutación es una resultante de la asociación física entre los

genes huéspedes y el profago de Mu-1 y la lisogenización es un requisito para la inducción de la mutación, por lo que ésta no sólo depende de la infección sino también de la lisogenización previa de las bacterias sensitivas (27).

La integración de Mu-1 en el cromosoma de E. coli ocurre inespecíficamente, a diferencia del fago λ , el cual tiene un sólo sitio de inserción.

Hay evidencias de que la integración de Mu-1 es por inserción lineal de su genoma en el DNA de la bacteria lisogénica huésped (19) y se sabe que el profago no está permutado circularmente, ya que presenta la misma secuencia de nucleótidos en el mismo orden en que la tiene el DNA del bacteriofago maduro (20), suponiéndose que después de la infección, el DNA de Mu-1 forma una molécula circular, la cual se inserta dentro del cromosoma bacteriano de acuerdo al modelo de Campbell (10), pero el punto de inserción es en el empalme de los dos extremos de la molécula lineal madura.

El DNA de Mu-1 es similar al DNA de E. coli en cuanto a su composición de bases, densidad de flotación y temperatura de fusión; en cuanto a su peso molecular, se estima que es de 25×10^6 daltones, con un largo aproximado de $12.9 \pm 0.007 \mu m$ ó de $14.5 \mu m$ (19,27). Por lo que respecta a sus dimensiones, se han obtenido mediante purificación del fago Mu-1 por centrifugación diferencial y centrifugación en gradientes de CsCl - (29) y examinándolo posteriormente al microscopio electrónico, a saber: la cabeza tiene un diámetro de 540 \AA y forma octahédrica; la cola contraída mide $1\ 000 \times 180 \text{ \AA}$ y extendida $556 \times 225 \text{ \AA}$. La vaina interna de la cola mide $1\ 080 \text{ \AA}$ y tiene un diámetro externo de 80 \AA y uno interno de 27 \AA . La placa basal tiene un diámetro de 225 \AA y de ésta parten dos o tres fibras con un largo de 315 \AA (12, Fig. 3).

Como ya se ha mencionado, la inserción del profago Mu-1 es al azar;

hay exclusión de la recombinación entre las mutaciones inducidas por Mu situadas muy cerca una de otra y hay ausencia de deleciones muy grandes del DNA del huésped en el punto de inserción de Mu-1 (9). También se observa que una cepa lisogénica para Mu-1 es inmune a nuevas infecciones por el fago y que, en experimentos de conjugación, existe el fenómeno de inducción cigótica.

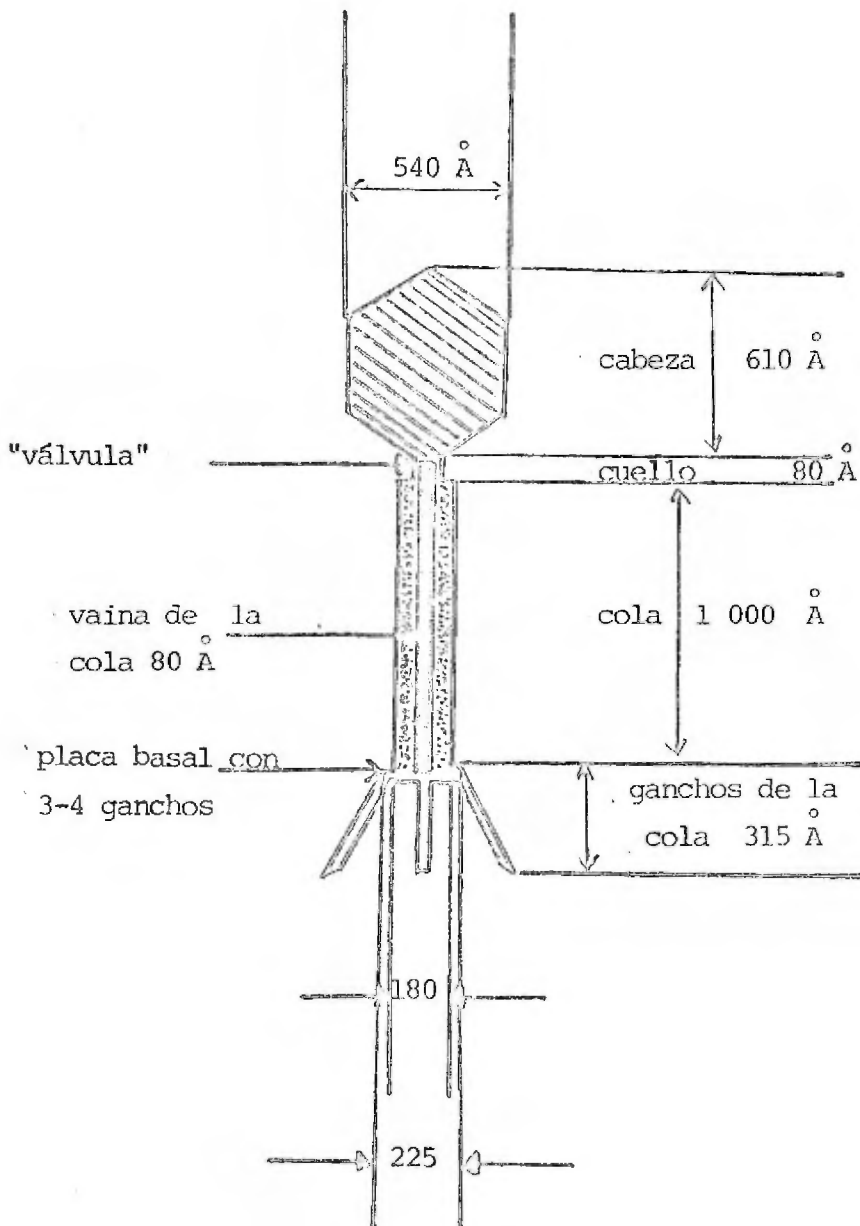
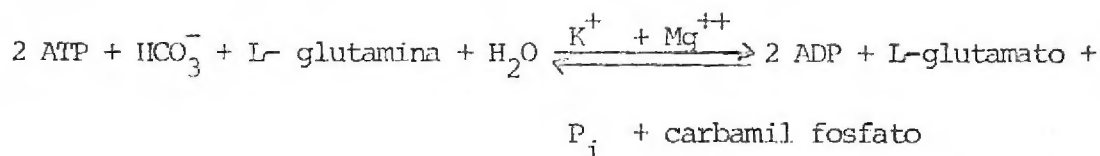


Fig Num. 3.- Dimensiones del bacteriofago Mu-1

Carbamil fosfato sintetasa

La carbamil fosfato sintetasa (CPS), es una enzima que, en E. coli, cataliza la síntesis de carbamil fosfato (CP) mediante la siguiente reacción (6):



El CP es un precursor de las dos vías metabólicas cuyos productos finales son arginina y nucleótidos de pirimidinas respectivamente (Fig. 2), a diferencia de otros microorganismos, como las levaduras y Neurospora crassa, en los cuales existen dos CPS, cada una específica para cada vía metabólica y reprimidas independientemente por los productos finales de la vía correspondiente (23).

En E coli el sustrato específico que utiliza la CPS para la biosíntesis de carbamil fosfato es la glutamina (23), aunque está reportado que también se puede utilizar NH_4^+ como donador de nitrógeno (16).

La síntesis de CPS está reprimida por los productos finales de ambas vías metabólicas, mientras que su actividad está parcialmente retroinhibida por el nucleótido uridina-5'-monofosfato (UMP), siendo esta retroinhibición antagonizada por la ornitina, que es producto intermediario de la vía metabólica de arginina (Fig. 4). Asimismo se ha reportado que la CPS es activada por IMP y otros productos finales de la biosíntesis de nucleótidos de purinas (7).

Anderson y Marvin (4) encontraron que la ornitina no sólo antagoniza el efecto de UMP sino que por sí misma activa la enzima y que las propiedades de esta activación son similares a aquellas que se observan con IMP. Empleando filtración por geles en Sephadex G-200 y centrifugación en gradientes de sacarosa, mostraron que el tamaño de la molécula de la enzima

es aumentado en presencia de ornitina ó PMP (efectores alostéricos positivos) y disminuído en presencia de UMP (efector alostérico negativo) (4).

Todas estas interacciones proveen un mecanismo de regulación muy eficiente, ya que un aumento en la concentración intracelular de los nucleótidos de pirimidinas afecta la actividad de la CPS y de la ATC (Fig.4) y, por lo tanto, se reducen las concentraciones de CP y pirimidinas. La inhibición de la sintetasa dura mientras no se necesita síntesis de arginina, pero una alta concentración intracelular de ésta produce una retroinhibición de la acetil glutamato sintetasa, que es la primera enzima de la secuencia de arginina (Fig.4). Por lo tanto, el flujo de metabolitos en dirección de la ornitina, se detiene y la CPS queda bajo control directo de la poza de nucleótidos de pirimidinas. Una limitación en la concentración de arginina, eliminando la inhibición de la acetil glutamato sintetasa, abre el flujo de metabolitos a través de la vía de arginina, y, produciendo una acumulación de ornitina, la cual antagoniza la inhibición por UMP, asegura el suplemento de CP para la vía de arginina en tanto se necesite (24).

Este mecanismo es tan eficiente como el que se encuentra en Sacharomyces cerevisiae, con dos enzimas independientemente reguladas.

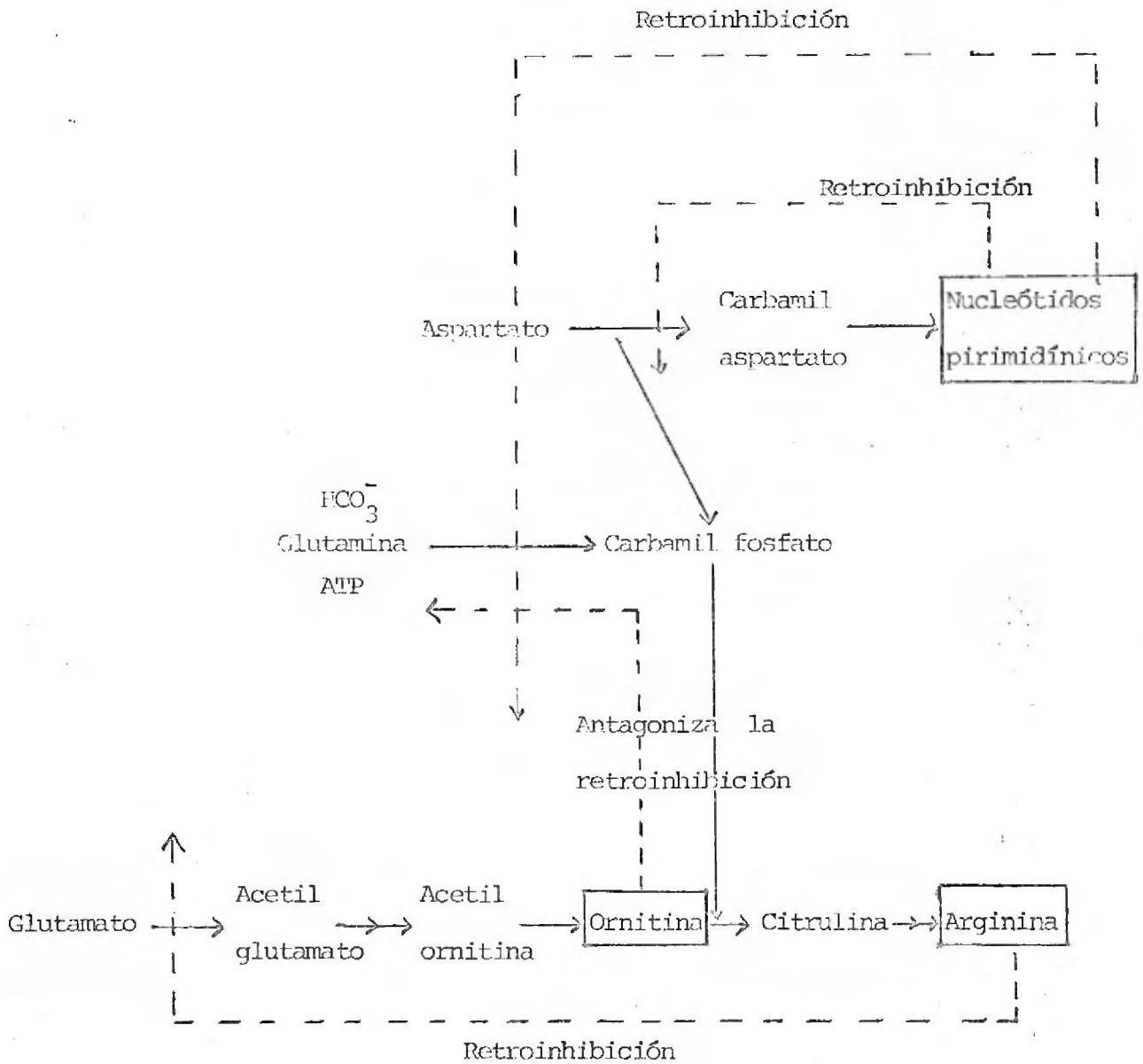


Fig. 4.- Control de las actividades en las vías metabólicas de arginina y pirimidinas en *E. coli* (24)

MATERIALES Y METODOS

A.- Cepas bacterianas. (Todas derivadas de E. coli K-12).

CEPA	SEXO	GENOTIPO #	DERIVACION	FUENTE
JM 1	HfrH	prototrofa	AB 259	A.Taylor
JM 3	Hfr	leu ⁻ thr ⁻ lac ⁻ B ₁ ⁻ Sm ^R	AB 312	"
JM 18	♀	leu ⁻ thr ⁻ lac ⁻ λ ⁺ Sm ^R	W 2085	"
JM 24	F ⁺	met F ⁻ :: (Mu ⁺)	AT 2114	"
JM 38	HfrH	pyr A ⁻	AB 259 NG	"
JM 43	♂	pyr A ⁻ :: (Mu ⁺) λ ⁺ Sm ^S	AB 261 X AT 2514	"
JM 44	♀	his ⁻ ade ⁻ arg E ⁻ pyr B ⁻ B ₁ ⁻ Sm ^R	AB 359	"
JM 46	Hfr	λ ⁺ Sm ^S	AT 2571	"
JM 53	♂	thr ⁻ pyr A ⁻ leu ⁺ Sm ^S	AT 2473 NG	"
JM 89	F ⁺	pyr A ₁₃ ⁻ :: (Mu ⁺) λ ⁺ Sm ^S	AT 2571 Mu ind.	"
JM 139	Hfr	leu ⁻ thr ⁻ ilv ⁻ rec A ₅₆	JC 5088	F.Bastarrachea
JM 400	F ⁻	pyr B ⁻ his ⁻ leu ⁻ ade ⁺ arg E ⁺ B ₁ ⁻ Sm ^R	JM 44 X JM 3	Este laboratorio
JM 405	♀	leu ⁺ thr ⁻ his ⁻ pyr B ⁻ Sm ^R P ₁ ⁻ λ ⁻ Mu ⁻	JM 400 X JM 450	"
JM 406	♀	thr ⁺ leu ⁺ his ⁻ pyr E ⁻ arg ⁺ pyr A ₁₃ ⁻ :: (Mu ⁺) λ ⁻ P ₁ ⁻	JM 405 inf. P ₁ ⁸⁹	"
JM 407	♀	his ⁻ pyr A ₁₃ ⁻ :: (Mu ⁺) pyr B ⁻ B ₁ ⁻ Sm ^R	JM 406 inf. P ₁ ¹	"
JM 409	F ⁻	leu ⁻ / leu ⁺ thr ⁻ / thr ⁺	MX 177	F.Bastarrachea
JM 411	♀	thr ⁺ pyr A ₁₃ ⁻ :: (Mu ⁺) leu ⁻ lac ⁻ λ ⁺ P ₁ ⁺ Sm ^R	JM 18 inf. P ₁ ⁸⁹	Este laboratorio
JM 412	♀	pyr A ₁₃ ⁻ :: (Mu ⁺) leu ⁻ lac ⁻ thy ⁻ λ ⁺ Sm ^R	JM 411 aminopt.	"

CEPA	SEXO	GENOTIPO #	DERIVACION	FUENTE
JM 413	♀	pyr A ₁₃ ⁻ :: (Mu ⁺) leu ⁻ lac ⁻ rec A ₅₆ λ ⁺ Sm ^r	JM 412 X JM 139	Este laborat
JM 414	F ⁻	pyr A ₁₃ ⁻ :: (Mu ⁺) leu ⁻ / leu ⁺ lac ⁻ rec A ₅₆ λ ⁺ Sm ^r	JM 413 X JM 409	"
JM 450	HfrH	thr ⁻ leu ⁺ pyr A ⁺ Sm ^s	JM 53 inf. P ₁ ¹	"
C 600 P ₁ ⁺	♀	leu ⁻ thr ⁻ P ₁ ⁺	C 600 inf. P ₁	A.Taylor
ATCC 9637		Mu-1+		ATCC

Nomenclatura según Taylor, A. L. (28).

⁻ = requiere para crecer y ⁺ = no requiere para crecer

leu = leucina

thr = treonina

lac = lactosa (utilización de L-lactosa)

B₁ = Vitamina B₁

met = metionina

pyr = pirimidinas

ilv = isoleucina-valina

thy = timina

his = histidina

arg = arginina

ade = adenina

Sm^r = streptomycin resistente y Sm^s = streptomycin sensible

rec A = deficiente en recombinación

Hfr = Alta frecuencia de recombinación

La notación :: (Mu⁺), indica que el fago Mu-1 está integrado en ese locus.

B.- Cepas de bacteriofagos

El fago Mu-1 se obtuvo a partir de una placa formada sobre la cepa - JM 1 después de poner en contacto medio donde se había crecido la cepa JM 24. Por ciclos sucesivos de infección sobre la JM 1, se aumenta el título.

El fago P₁ se obtuvo por el mismo procedimiento, sólo que en su caso se partió de la cepa C 600 P₁⁺, aumentándose el título por infecciones sucesivas sobre la JM 1.

C.- Medios de cultivo

Medio completo

Tryptona (Bacto)	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
Cloruro de sodio	10 g.
Timina	30 mg.
Agua desionizada	1 lt.
Se ajusta el pH a 7 con NaOH	

Medio mínimo

Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	6 g.
KH ₂ PO ₄	3 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.
Mg SO ₄ sol. 10 %	2 ml.
Fe SO ₄ sol. 0.05 %	1 ml.
Ca (NO ₃) ₂ sol. 1%	1 ml.
Agua desionizada	1 lt.

Se añade por separado glucosa al 20% (10 ml), vitamina B₁ y demás requerimientos según la cepa.

MÉTODOS

1.- Determinación de la actividad de ornitino transcarbamilasa (OTC).

Se usaron las cepas JM 46 (prototrofa) y JM 89 (mutante).

Se crecieron ambas cepas durante la noche en 10 ml de medio mínimo con arginina. Al día siguiente se inocularon con estos cultivos, 100 ml del mismo medio, creciendo las células hasta 40 Unidades Klett (U.K.).

Se centrifugaron a 6 000 r.p.m. durante 15 minutos a 5°C, resuspendiendo las células en 5 ml de Buffer TRIS 0.01 M, pH 8.5 para lavarlas, resuspendiendo después en 5 ml del mismo Buffer.

Se agregó tolueno para permeabilizar, a razón de 0.02 ml por mililitro de suspensión y se incubó a 37°C, con agitación, durante 30 minutos.

La mezcla de reacción contiene, en un volumen final de 1 ml:

0.3 ml de carbamil fosfato 6.6×10^{-2} M

0.1 ml de buffer TRIS 10^{-1} M, pH 8.5

0.1 ml de ornitina 2×10^{-1} M

0.5 ml de bacterias toluenizadas a diferentes diluciones, según la siguiente tabla:

Enzima	Buffer TRIS 10^{-2} M, pH 8.5
0.05 ml	0.45 ml
0.1 ml	0.4 ml
0.2 ml	0.3 ml
0.5 ml	0.0 ml

Como control se tomó 1 ml de bacterias toluenizadas y se calentaron a 90 °C durante 20 minutos, porque se sabe que hay formación de carbamil fosfato sin enzima (8). Se utilizaron 0.05 y 0.5 ml de enzima calentada.

Una vez agregada la enzima, se incubó la mezcla de reacción a 37 °C

en baño de agua durante 30 minutos. Al finalizar la incubación, se paró la reacción con 5 ml de Ac. tricloroacético al 5%.

Se centrifugó para bajar las células y se tomó 1 ml del sobrenadante, pasándolo a un tubo para medir la cantidad de citrulina formada, por un método colorimétrico (13), el cual se describe a continuación :

A cada tubo se añaden 0.5 ml de diacetil monoxina, 0.5 ml de H_2SO_4 c. y 0.5 ml de semidina, en ese orden, mezclando perfectamente y a continuación se calienta la mezcla a $90^\circ C$ por 10 min. en baño de agua. Se enfrían las muestras a temperatura ambiente por 5-10 min. Se añade 1 ml de una mezcla $H_2SO_4 - FeCl_3$, cuidando de dirigir ésta hacia el centro del tubo, mezclando perfectamente y dejando enfriar a temperatura ambiente por lo menos 5 min. antes de leer.

Se lee a $550 m\mu$ en un espectrofotómetro contra un blanco de reactivos.

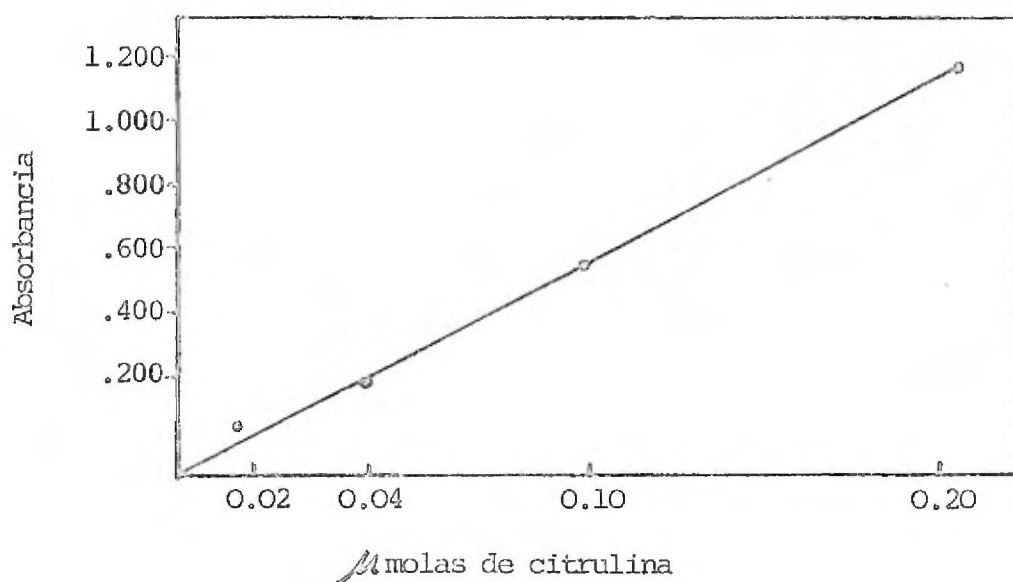


Fig 5.- Curva standard de citrulina obtenida bajo las condiciones descritas en el método. La absorbancia se lee a $550 m\mu$.

II.- Purificación de OTC para medir actividad de carbamil fosfato sintetasa.

Se creció la cepa JM 46 en medio mínimo, con agitación, a 37°C y se colectaron las células al llegar a 80 U.K., centrifugando a 3 000 r.p.m. durante 15 min. y resuspendiendo en 5 ml de buffer TRIS 0.01 M, pH 8.5.

Se sonicaron a 5°C por 5 min. y se centrifugaron a 21 000 X g a 0°C por 10 min. y después a 30 000 X g a 10°C por 30 min. (26).

El sobrenadante del sonificado se llevó a 100 ml con buffer. Estos 100 ml se llevaron a 65°C en 4 min. con agitación en un baño de agua a 70°C. Se mantuvieron a 65°C por 5 min. y después se bajó la temperatura a 10°C en 1.5 min. Se eliminó el precipitado por centrifugación a 6 000 X g durante 15 min.

A esta porción de 100 ml de enzima, se agregó 31.28 g de sulfato de amonio lentamente y con agitación continua. Después de la adición de la sal, se centrifugó y al sobrenadante se le agregó 23.8 g. de sulfato de amonio adicionales, colectándose el precipitado por centrifugación y se resuspendió en 5 ml de buffer TRIS 0.01 M, pH 8.5.

Se pasó por una columna de Sephadex G-25 previamente equilibrada con buffer TRIS 0.01 M, pH 8.5, desechando los primeros 5.5 ml y colectando los siguientes 4 ml, donde se encuentra concentrada la enzima. En esta fracción se midió actividad de OTC por formación de citrulina, usando el método colorimétrico ya descrito (13).

III.- Determinación de la actividad de carbamil fosfato sintetasa (CPS)

Se crecieron las cepas JM 46 (prototrofa), JM 38 (pyr A⁻ clásica) y JM 89 (pyr A⁻ rara), durante la noche en 500 ml de medio mínimo con arginina y uracilo. Se colectaron las células al llegar a 80 U.K., centrifugando a 3 000 r.p.m. durante 15 min. Se resuspendieron en 5 ml de buffer

de fosfatos (KH_2PO_4) 0.05 M, pH 7.5. Se sonicaron por 5 min. a 5°C. Se centrifugaron a 10 000 X g durante 15 min. y el sobrenadante se pasó por una columna de Sephadex G-25. Se tomó una alícuota y se midió cantidad de proteínas por el método de Lowry (17).

La actividad de CPS se midió acoplando la reacción con OTC purificada (22).

La mezcla de reacción contiene (en micro molas) en 2 ml de volumen final : KH_2PO_4 , pH 7.5, 175; glutamina, 12; KHCO_3 , 60; ATP, 24; MgCl_2 , 24; ornitina, 12; un exceso de OTC parcialmente purificada de E. coli (26) y el extracto de las diferentes cepas.

La mezcla se incubó a 37°C por 30 min., parándose la reacción con 2 ml de HCl 2N, seguido por 10 min. de ebullición. Se centrifugó y se tomó 1 ml, pasándolo a un tubo donde se mide la cantidad de citrulina formada, por la reacción colorimétrica ya descrita (13).

Los extractos de las tres cepas contenían diferentes cantidades de - proteínas, pero se agregó la misma cantidad, ya que se diluyó en buffer.

IV.- Determinación de la actividad de CPS, radioisotópicamente.

Se crecieron las cepas JM 46 y JM 89 en medio mínimo con arginina. Se colectaron al llegar a 80 U.K. centrifugándose a 3 000 r.p.m. durante 15 min. a 5°C. Se resuspendieron en buffer de fosfatos (KH_2PO_4) 0.05 M, pH 7.5. Se sonicaron por 5 min. a 5°C, centrifugándose a 10 000 X g durante 15 min. a 5°C y el sobrenadante se pasó por una columna de Sephadex G-25. Se tomó una alícuota y se determinó cantidad de proteínas por el método de Lowry (17).

La actividad de CPS se determinó por el método radioisotópico de Anderson y Meister (6). La mezcla de reacción contiene, en un volumen final de 1 ml : buffer de KH_2PO_4 , pH 7.6, 100 μ molas; MgCl_2 , 12 μ molas; ATP,

12 μ molas; KCl, 80 μ molas; glutamina, 10 μ molas; $^{14}\text{C-NaHCO}_3$, 15 μ molas, 500 000 c.p.m. y el extracto de las cepas.

La mezcla se incubó a 37°C por 10 min. en baño de agua y se paró la reacción añadiendo 0.1 ml de una solución que contenía NH_4OH 0.7 N y KOH 2.7 N (preparada inmediatamente antes de usarse). Bajo estas condiciones el ^{14}C -carbamil fosfato se convierte a ^{14}C -cianato. Después de dejar reposar por 10 min. adicionales a 37°C, se convierte el ^{14}C -cianato en ^{14}C -urea añadiendo 0.4 ml de NH_4Cl 4 M, pH 8.5, seguido por 10 min. de calentamiento a 100°C. Se centrifugó a 2 500 r.p.m. durante 10 min. y el sobrenadante se pasó por una columna de Dowex 1-X8 (OH^-), eluyéndose la ^{14}C -urea con 10 ml de agua. Se tomó una muestra de 1 ml y se colocó en un vial que contenía 10 ml de solución Bray, y la radiactividad se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido (1) Nuclear Chicago con una eficiencia de 69 %.

V.- Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Reactivos:

Sol. A.- Sulfato de cobre 1 % (en agua).

Sol. B.- Tartrato doble de sodio y Potasio 2 % (en agua).

Sol. C.- Carbonato de Sodio 2 % (en NaOH 0.1 N).

Sol. D.- 1 vol. de sol. A + 1 vol. de sol. B.

Sol. E.- 50 vol. de sol. C + 1 vol. de sol. D.

Sol. standard de albúmina (400 \checkmark / ml).

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Fenol) diluído 1:1 (en agua).

Técnica:

1.- Llevar la proteína a un volumen final de 1 ml con agua.

2.- Añadir 5 ml de sol. E y agitar.

3.- Dejar reposar durante 10 min.

- 4.- Añadir 0.5 ml de reactivo de Folín 1:1, agitar inmediatamente.
- 5.- Dejar reposar por 30 min.
- 6.- Leer a 730 milimicras con filtro rojo ó a 625 milimicras sin filtro

El standard se trata en las mismas condiciones que la muestra (17).

VI.- Técnica de propagación de P₁.

- 1.- Se crece la cepa donadora a una concentración de 5×10^9 cél/ml.
- 2.- Se diluye el "stock" de fago a 7×10^6 fagos/ml en medio completo.
- 3.- Se funden 4-5 tubos de medio completo- agar 0.5 % y a cada tubo se agrega 0.04 ml de Ca Cl_2 0.25 M.
- 4.- Trabajando con un tubo cada vez, se agrega 0.1 ml del cultivo de la cepa donadora y 0.1 ml de la dilución del fago.
- 5.- Se platea sobre 4-5 cajas de medio completo-agar 1 % (Ca^{++}).
- 6.- Se incuban las cajas durante 5-6 horas a 37°C.
- 7.- Se agrega a cada caja 2.5 ml de medio completo (Ca^{++}), y se incuban 2 horas más.
- 8.- Se toma el líquido que aparece en la superficie de las cajas y se centrifuga en tubos que contienen 0.5 ml de cloroformo.
- 9.- Se recoge el sobrenadante, se agrega 1 ml de cloroformo y se guarda en frío, previa titulación del fago, usando la cepa JM 1 como cepa indicadora. (debe dar un título de 10^9 - 10^{10} fagos/ml).

VII.- Técnica para experimentos de transducción.

- 1.- Se crecen 5 ml de las células receptoras hasta $3-5 \times 10^9$ cél/ml.
- 2.- Se centrifuga el cultivo a 2 500 r.p.m. durante 10 min. y se resuspenden las células en 1 ml de sol. salina 0.85 %. Se añade 0.1 ml de

CaCl₂ 0.25 M.

3.- Se diluye el lisado de P₁ 1:5 en medio completo (Ca⁺⁺) y se aerea suavemente en un baño maría a 37°C con agitación leve, (El lisado de P₁, - previamente crecido en la cepa donadora, es el donador en la transducción. (Ver propagación de P₁).

4.- Se mezclan 0.5 ml de la suspensión de células y 4.5 ml del lisado de P₁ aereado y se deja la mezcla en reposo a temperatura ambiente durante 30 min.

5.- Se centrifuga la mezcla a 2 500 r.p.m. durante 10 min. y se resuspende en 1 ml de sol. salina 0.85 %.

6.- Se diluye 10⁻¹ y 10⁻² en sol. salina y se platea sobre medio selectivo. El control se hace plateando 0.1 ml de la célula receptora en medio selectivo.

VIII.- Técnica para experimentos de conjugación.

1.- Se crece la célula donadora (macho) a una concentración de 3-5 X 10⁹ cél/ml.

2.- Se crece la célula receptora (hembra) a una concentración de 3-6 X 10⁹ cél/ml.

3.- Se colocan 0.5 ml de la célula donadora en un matraz con 10 ml de medio completo y se colocan 1 ml de la célula receptora en 10 ml de medio completo.

4.- Se crece la donadora a 35 U.K. y la receptora a 45 U.K.

5.- Se mezclan 0.5 ml de la donadora con 4.5 ml de la receptora.

6.- Se incuba la mezcla sin agitación, durante el tiempo designado.

7.- Se centrifuga a 2 500 r.p.m. durante 10 min. y se resuspende en 1 ml de sol. salina 0.85 %.

8.- Se platea 10⁰, 10⁻¹ y 10⁻² en medio selectivo. El control se hace

plateando 0.1 ml de la donadora y 0.1 ml de la receptora en medio selectivo.

IX.- Selección de mutantes espontáneas de Timina por tratamiento con aminopterina.

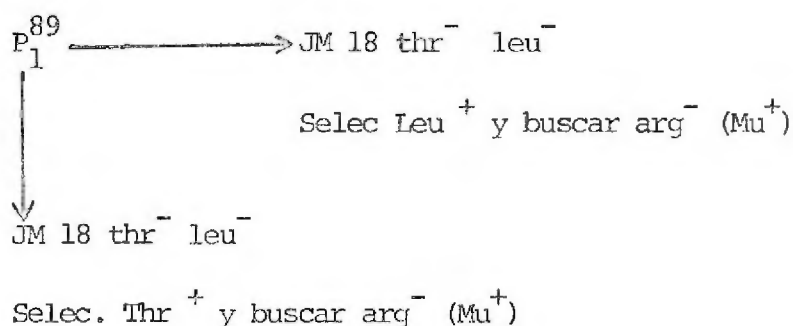
- 1.- Se esterilizan 5 mg de aminopterina en 1 ml de agua.
- 2.- La aminopterina estéril se añade a 10 ml de medio mínimo con 50 mg/ml de timina, glucosa y otros requerimientos.
- 3.- A 5 ml de este medio, se añade 0.1 ml del cultivo de células - previamente crecido a una concentración de 3×10^9 cél/ml.
- 4.- Se agita a 37°C hasta que se alcance una concentración de 3×10^9 cél/ml (cerca de 20 horas).
- 5.- Se pasa 0.1 ml de este cultivo a un segundo tubo con 5 ml del medio con aminopterina y se agita a 37°C hasta alcanzar la concentración anterior.
- 6.- Se platea sobre medio completo-agar 2 % y se buscan las colonias auxotrofas de timina (thy^-).

RESULTADOS

1.- En las figuras 6 y 7 se muestran las curvas de crecimiento de la cepa JM 89 pyr A₁₃ y de la cepa de la cual se originó la misma, la cepa JM 46 pyr A_{silvestre}.

2.- Mapeo del alelo pyr A₁₃ presente en la cepa JM 89.

Se siguió el procedimiento de cotransducción usando el fago P₁⁸⁹ como fago transductante. Se propagó el P₁ en la cepa JM 89 pyr A₁₃ y posteriormente se infectó con este P₁⁸⁹ una cepa leu⁻ thr⁻, seleccionando para leu⁺ y thr⁺ independientemente, buscando arg⁻ y comprobando que todas las arg⁻ son lisogénicas para Mu-1. Se usaron los marcadores leucina y treonina - porque se localizan muy cerca de pyr A en el cromosoma de E. coli (Fig.1).



Las frecuencias de cotransducción se muestran en la siguiente tabla:

ALELO	AGENTE MUTAGENICO	% COTRANSD. CON :
pyr A ₁₃	Genoma de Mu-1	thr 0.4 %
pyr A ₁₃	Genoma de Mu-1	leu menos de 0.4 %

Con este procedimiento se comprobó que el fago Mu-1 está integrado en gene pyr A de la cepa JM 89. Se obtuvo de esta manera la cepa JM 411 con

genotipo $\text{thr}^+ \text{leu}^- \text{pyr A}_{13}^- :: (\text{Mu}^+)$.

3.- Construcción de una cepa con una doble mutación:

$\text{pyr A}_{13}^- :: (\text{Mu}^+) \text{pyr B}^-$.

El motivo de la construcción de esta cepa, es que si la mutante pyr A_{13}^- es capaz de producir CP para pirimidinas, pero no para arginina, el hecho de no tener actividad en la siguiente enzima de la vía de biosíntesis de pirimidinas, específicamente la ATC (Fig. 2), pudiera favorecer una acumulación de CP que, en estas circunstancias, pudiera ser asequible para OTC y, como consecuencia, la célula pudiera sintetizar arginina.

Para la construcción de esta doble mutante se pensó primeramente introducir el gene pyr A_{13}^- en una cepa pyr B^- , por medio de una serie de pasos que se describen a continuación.

a).- Obtención de la cepa JM 400.

Partiendo de la cepa JM 44, se decidió construir una cepa arg E^+ . Esta cepa debe ser arg^+ genotípicamente, ya que de no ser así, no se podría saber si el efecto de requerir arginina para crecer, se debe al alelo pyr A_{13}^- ó al genotipo arg^- .

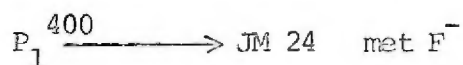
Se utilizó una conjugación entre las cepas JM 3 X JM 44, obteniéndose lo siguiente:

JM 3	Hfr	thr^+	leu^-	arg E^+	Sm^r
X					
JM 44	♀	pyr B^-	thr^-	his^-	$\text{ade}^+ \text{arg E}^- \text{Sm}^r$
			Selec. Thr^+	Arg E^+	
JM 400	F ⁻	pyr B^-	his^-	leu^-	

b).- Comprobación de que la JM 400 es arg^+ genotípicamente.

Se creció el fago P_1 en la cepa JM 400 y se infectó con él una cepa

met F⁻, seleccionando para met⁺ y buscando arg⁻: todas deben ser arg⁺

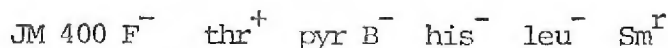


Selec. Met⁺ y buscar arg⁻

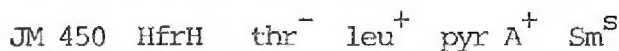
De las 50 colonias probadas todas fueron arg⁺

c).- Obtención de la cepa JM 405.

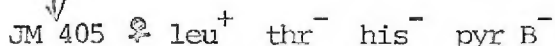
El objeto es tener un marcador cotransducible con pyr A, como es - - thr, para transducir pyr A₁₃; por lo tanto, la cepa JM 400, que es thr⁺, se volverá thr⁻, por medio de la siguiente conjugación:



X



Selec. Leu⁺ y buscar thr⁻



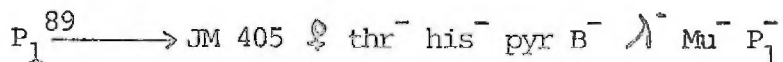
d).- Comprobación de que la JM 405 es no-lisogénica para P₁, λ y Mu-1.

Esta comprobación se hizo por medio de réplica sobre cepas lisogénicas para los fagos requeridos y se vió que no se presentaba lisis.

Por este medio se comprobó que la cepa JM 405 es no-lisogénica para los tres fagos mencionados.

e).- Obtención de la doble mutante (JM 406).

Esto se logró mediante una transducción con el fago P₁ creciendo previamente en la cepa JM 89 pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺), sobre la JM 405, seleccionando para Thr⁺ y buscando arg⁻ ura⁻ (Mu⁺).



Selec. Thr⁺ y buscar arg⁻ ura⁻ Mu⁺

De este modo se obtuvo la cepa JM 406 que tiene el siguiente genotipo:

JM 406 ♀ thr⁺ leu⁺ his⁻ pyr B⁻ pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺) λ⁻ P₁⁻ Mu⁺

En la Fig. 8 se vé el patrón de crecimiento de la cepa JM 406 en diferentes metabolitos. Como puede verse, esta cepa no requiere ya arginina para crecer. Para demostrar que el alelo pyr A₁₃ estaba en la célula, se decidió sustituir el alelo pyr B⁻ por el silvestre y ver si la cepa requería de nuevo arginina para crecer (JM 407), lo que demostraría la presencia de pyr A₁₃.

f).- Obtención de la cepa JM 407.

Se utilizó el fago P₁ crecido en la cepa JM 1 prototrofa e infectando la cepa JM 406, seleccionando para ura⁺ y buscando arg⁻.

P₁¹ —————→ Jm 406 ♀ thr⁺ leu⁺ his⁻ pyr B⁻ pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺)

Selec. Ura⁺ y buscar arg⁻ (Mu⁺).

De 50 colonias probadas, todas fueron Ura⁺ arg⁻ (Mu⁺).

En la Fig. 9 se muestra la curva de crecimiento de la cepa JM 407.

4.- Construcción de una cepa merodiploide para el gene pyr A.

El objeto de construir esta cepa es averiguar si, cuando hay una doble dosis de gene pyr A, uno silvestre y el pyr A₁₃, el silvestre es dominante sobre el pyr A₁₃ o viceversa.

Para esto se pensó en introducir en una cepa pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺), un episoma que tenga el primer minuto del cromosoma de E. coli, y observar cuales son los requerimientos de esta cepa merodiploide.

a).- Obtención de la cepa JM 412 thy⁻.

Se utilizó la técnica de selección por aminopterina para mutante thy⁻ partiendo de la cepa JM 411 que es pyr A₁₃⁻

JM 411 ♂ leu⁻ pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺) thr⁺
 ↓ Selección con aminopterina
 para mutantes thy⁻
 JM 412 ♀ pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺) leu⁻ thy⁻

b).- Obtención de la cepa JM 413 thy⁺.

Se usó la técnica de conjugación con la cepa JM 139 rec A₅₆⁻, seleccionando para Thy⁺. La idea es introducir el alelo rec A₅₆ para impedir que el episoma recombine con el cromosoma.

JM 412 ♀ pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺) leu⁻ thy⁻
 X
 JM 139 Hfr rec A₅₆⁻
 ↓ Seleccionar Thy⁺
 JM 413 ♀ pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺) leu⁻ rec A₅₆⁻

c).- Obtención de la cepa JM 414 merodiploide para pyr A.

Se usó una conjugación con la cepa JM 409 que tiene el episoma con el primer minuto del cromosoma de E. coli, seleccionando para Thr⁺.

JM 413 ♀ pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺) leu⁻ rec A₅₆⁻
 X ○
 JM 409 F⁻ leu⁻/leu⁺ thr⁻/thr⁺
 ↓ Seleccionar para Thr⁺
 JM 414 F⁻ pyr A₁₃⁻ :: (Mu⁺) leu⁻/leu⁺ lac⁻ rec A₅₆⁻

La cepa JM 414 presenta un patrón de crecimiento que se muestra en la Fig. Num. 10.

Como se vé la presencia de ambos alelos pyr A en un mismo genoma, tiene un fenotipo normal, lo cual habla de una dominancia del silvestre sobre el pyr A₁₃.

Sin embargo, como se verá más adelante, se midió la actividad de la CPS en la merodiploide para descartar cualquier otro efecto.

5.- Determinación de la actividad de la OTC en las cepas JM 46 y JM 89.

De acuerdo con la idea de que la mutante careciera de actividad enzimática de ornitino transcarbamilasa, se procedió a medir la actividad específica de esta enzima comparativamente con la de la célula de la cual provenía, utilizando el método colorimétrico de Hunninghake y Grisolia (13).

El resultado se puede ver en la siguiente tabla (No. 1) :

CEPA	ALELO	ACTIVIDAD <i>μ</i> molas citrulina / mg peso seco / min.
JM 46	silvestre	0.0048
JM 89	pyr A ₁₃	0.0046

De acuerdo con estos datos, las actividades de ambas enzimas son semejantes, de lo que se deduce que la mutante tiene la OTC normal.

○

6.- Determinación de la actividad de la CPS en las cepas JM 46 y JM 89.

Sabiendo que la mutante tiene actividad de OTC normal y de acuerdo con la vía metabólica (Fig. 2) y las características fenotípicas de la misma, se procedió a medir actividad enzimática de carbamil fosfato sintetasa usando el método colorimétrico de Hunninghake y Grisolia (13), acoplado la reacción con OTC parcialmente purificada (26) según Piérard y Wiame (22).

La tabla No. 2 ilustra los resultados obtenidos:

CEPA	ALELO	ACTIVIDAD <i>μ</i> molas citrulina / mg prot. / min.
JM 46	silvestre	0.0022
JM 89	pyr A ₁₃	no detectable
JM 38	pyr A	no detectable

Como puede verse en la tabla, la actividad de la CPS de la mutante no es detectable por este método.

7.- Determinación de la actividad de la CPS utilizando un método radioisotópico.

Ya que no se detectó actividad de CPS por el método colorimétrico, se pensó en utilizar un método más sensible, como es el radioisotópico según Anderson y Meister (6) y Abd-El-Al e Ingraham (1).

Los resultados se ilustran en la tabla No. 3 :

CEPA	ALELO	ACTIVIDAD <i>μ</i> molas CP / mg prot. / hr.
JM 46	silvestre	1.57
JM 89	pyr A ₁₃	0.080

Por este método sí se detecta actividad de CPS en la mutante, aunque se ve que esta actividad corresponde a un 6 % de la actividad original de la cepa silvestre.

8.- Propiedades de la CPS de la cepa JM 89 comparada con la CPS de la cepa JM 46.

Al saber que la mutante tenía actividad de la CPS, aunque disminuida

hasta un 6 %, se procedió a determinar algunas de sus propiedades comparándola con la cepa de la cual proviene.

A.- Presencia o ausencia de inhibidores de la CPS determinando actividad de la enzima en mezclas de las CPS de ambas cepas.

Los resultados se ilustran en la tabla Num. 4 a continuación :

CEPA	ALELO	ACTIVIDAD <i>μ</i> .molas CP / mg prot. / hr.
JM 46	silvestre	1.59
JM 89	pyr A ₁₃	0.084
mezcla JM 46 + JM 89	silvestre y pyr A ₁₃	0.815

Nota: la actividad de la mezcla se mide en la misma cantidad de proteína, lo que implica la mitad de la enzima silvestre.

Estos datos nos demuestran que cuando se mezclan ambas enzimas hay una suma de sus actividades, lo cual se traduce en una ausencia de inhibidores de la CPS en la cepa JM 89.

B.- Actividad de la CPS de la cepa merodiploide (JM 414) en comparación con la JM 46 y JM 89.

Se midió la actividad de la enzima de esta cepa, porque lleva doble dosis de gene, es decir, el gene silvestre y el gene pyr A₁₃.

Los resultados se pueden ver en la tabla No. 5 :

CEPA	ALELO	ACTIVIDAD
		μ mol CP / mg prot. / hr.
JM 46	silvestre	1.59
JM 89	pyr A ₁₃	0.083
JM 414	silvestre/ pyr A ₁₃	1.65

Como puede observarse, la actividad de la CPS de la JM 414 es la suma de las actividades de las CPS de la JM 46 y la JM 89.

C.-Actividad de la CPS usando glutamina ó NH_4Cl como fuente de nitrógeno.

Kalman (16) demuestra que el NH_4Cl puede ser usado en vez de glutamina como fuente de nitrógeno, aunque la Km es 200 veces mayor. Es por esta razón que se usaron $100 \mu\text{M}$ totales por ml de reacción, de NH_4Cl en lugar de $10 \mu\text{M}$ que son las que se utilizan para glutamina.

Los resultados se anotaron en la tabla No. 6 :

CEPA	ALELO	ACTIVIDAD	
		μ molas CP / mg prot. / hr.	
		usando $10 \mu\text{M}$ glutamina	usando $100 \mu\text{M}$ NH_4Cl
JM 46	silvestre	1.57	1.49
JM 89	pyr A ₁₃	0.081	0.080

Se concluye que la CPS de la mutante utiliza con igual eficiencia el NH_4Cl en lugar de la glutamina como fuente de nitrógeno.

D.- Efecto de los moduladores alostéricos UMP y Ornitina sobre la actividad de la CPS en las cepas JM 46 y JM 89.

Se sabe que el UMP inhibe la actividad de la CPS (4, 7, 23) y que la ornitina antagoniza esta acción aumentando la actividad de la enzima (24).

La tabla No. 7 ilustra estos datos:

CEPA	ALELO	ACTIVIDAD (μ molas CP / mg prot. / hr.)						
		Ninguno	UMP 10^{-4} M	% act.	UMP 10^{-4} M + ORN 5×10^{-5} M	% act.	ORN 10^{-4} M	% act.
JM 46	silvestre	1.56	0.338	21	1.236	78	2.832	175
JM 89	pyr A ₁₃	0.079	0.014	17.8	0.054	76	0.135	169

Como se observa en la tabla No. 7, el UMP inhibe a ambas enzimas, mientras que al agregar ornitina a la mezcla, la actividad aumenta considerablemente, y cuando se usa ornitina sola, ésta es capaz de aumentar la actividad a más del 100 %, en ambas cepas.

E.- Estabilidad de la CPS de la cepa JM 89 con respecto de la CPS de la cepa JM 46.

Ambas enzimas se guardaron a -15°C en 20 % de glicerol a pH 5, para determinar la estabilidad de la actividad en relación al tiempo.

Los resultados se muestran en la tabla No. 8:

CEPA	ALELO	ACTIVIDAD (μ molas CP / mg prot. / hr.)		
		0 días	5 días	9 días
JM 46	silvestre	1.578	1.524	1.534
JM 89	pyr A ₁₃	0.083	0.002	no detectable

Como puede verse en la tabla No. 8, la enzima de la JM 89 no es estable, a diferencia de la enzima de la JM 46 que sí lo es.

F.- Intentos de purificación de la CPS de la cepa JM 89.

Se intentó purificar la enzima de la mutante siguiendo el procedimiento de Anderson y Meister (6), que consistió en los siguientes pasos: extracto crudo sin tratar; extracto crudo calentado a 56°C; extracto crudo tratado con sulfato de protamina y extracto crudo tratado con sulfato de amonio.

Los resultados se ilustran en la tabla No. 9 :

PASO DE PURIFICACION	CEPA	ALELO	ACTIVIDAD μ molas CP / mg prot. / hr.
Extracto crudo	JM 46	silvestre	1.56
	JM 89	pyr A ₁₃	0.081
Calentamiento a 56°C por 4 min.	JM 46	silvestre	2.714
	JM 89	pyr A ₁₃	0.022
Sulfato de protamina	JM 46	silvestre	2.392
	JM 89	pyr A ₁₃	0.0174
Sulfato de amonio	JM 46	silvestre	2.191
	JM 89	pyr A ₁₃	No detectable

Como puede verse en la tabla, la actividad de la CPS de la JM 89 decrece en cada paso de purificación, por lo que no se logró purificarla, al menos por este procedimiento.

G.- Determinación de las Km aparentes de los tres sustratos de la CPS: ATP, glutamina y HCO₃⁻.

Según Anderson y Meister (6) la Km para ATP es de 8×10^{-4} M, mientras que para bicarbonato es de 12×10^{-4} M y para glutamina es de 3.8×10^{-4} M.

Al graficar velocidad en función de la concentración de sustrato, la curva para ATP es de tipo sigmoide, a diferencia de los otros dos sustratos, los cuales no forman curvas sigmoides sino hiperbólicas (6).

Se determinaron las constantes de Michaelis para los sustratos ATP, - glutamina y HCO_3^- de la CPS de la cepa silvestre y de la codificada por el alelo pyr A₁₃.

Las curvas contra sustrato, tanto de la cepa JM 46 como de la JM 89, se muestran en las Figs. No. 11, 12, 13, 14, 15 y 16.

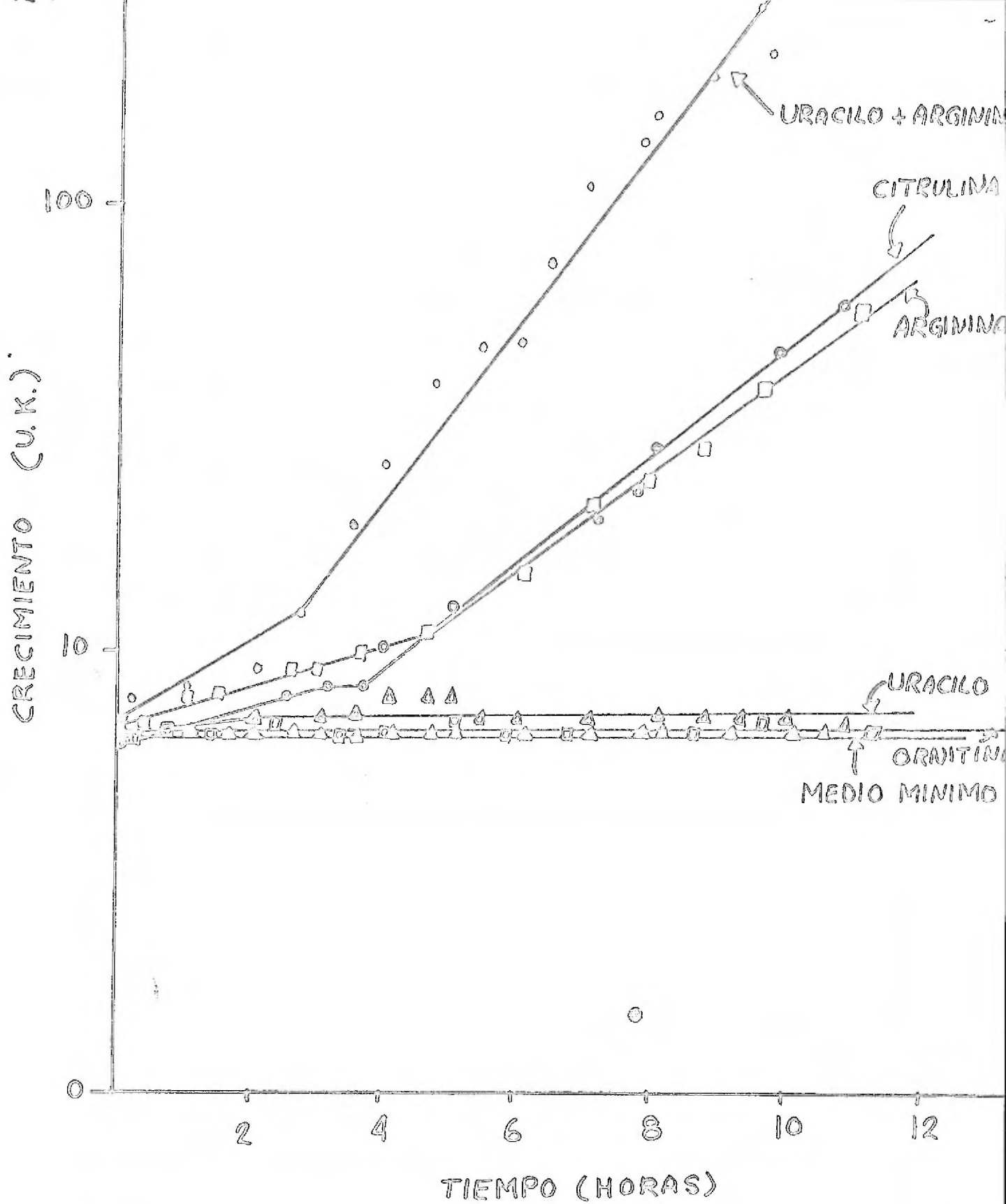


Fig. Num. 6.- Curva de crecimiento de la cepa JM 89 pyr A₁₃ :: (Mu-1)⁺
 en medio mínimo suplementado con diferentes metabolitos.

CRECIMIENTO (U.K.)

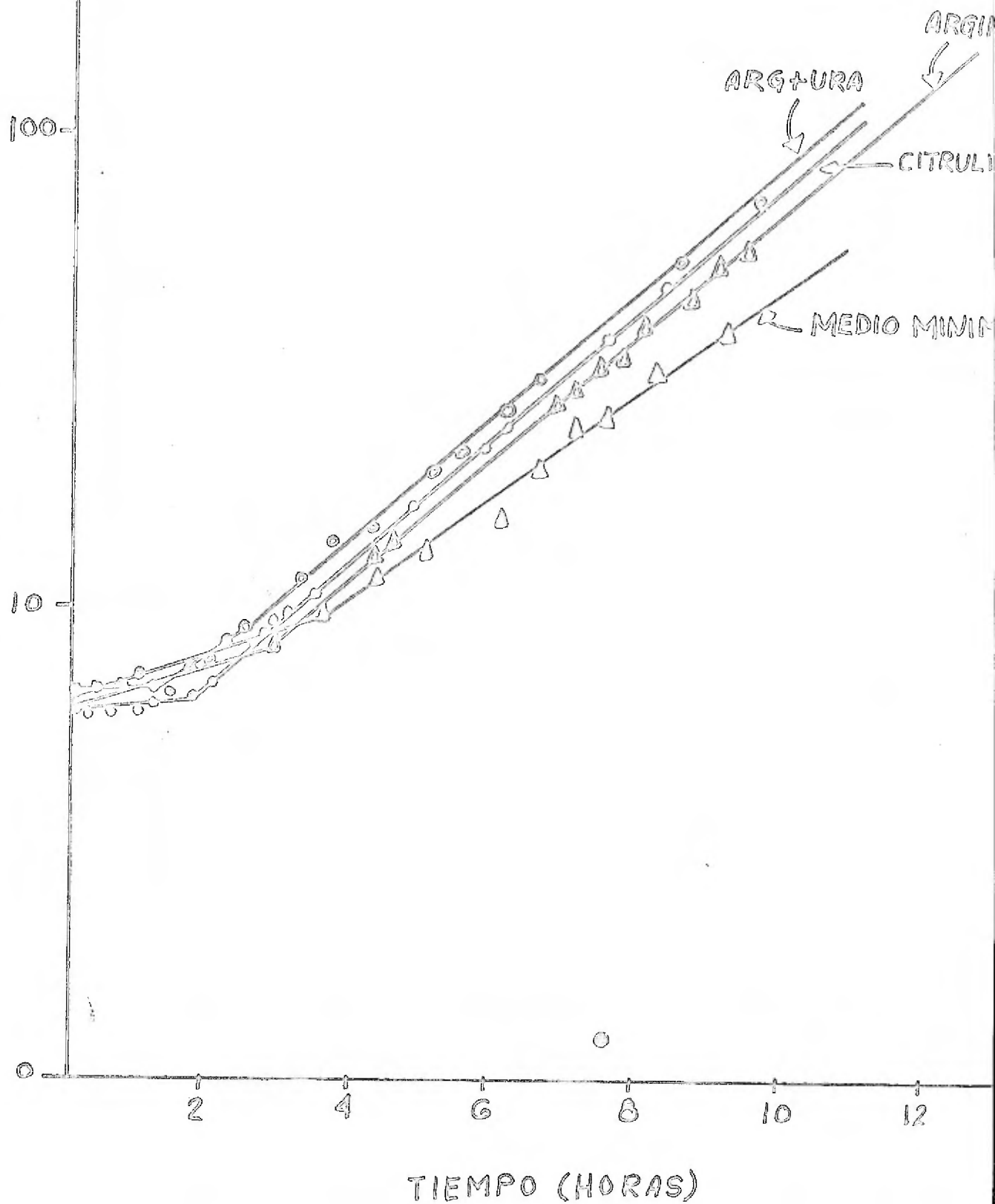


Fig. Num. 7.- Curva de crecimiento de la cepa JM 46 en medio mínimo suplementado con diferentes metabolitos.

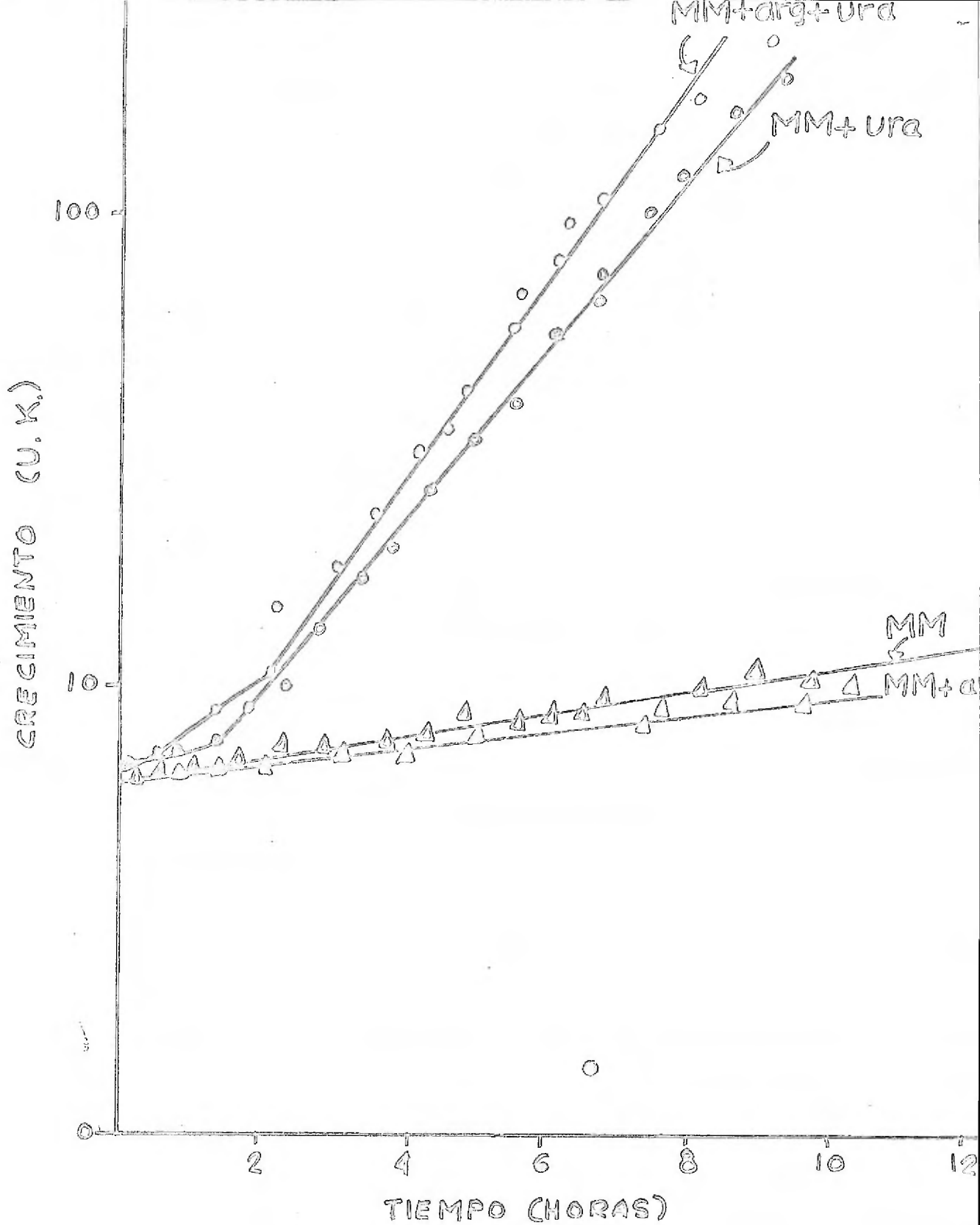


Fig. Num. 8.- Curva de crecimiento de la cepa JM 406 pyr A₁₃ :: (Mu⁺), pyr B⁻ en medio mínimo suplementado con diferentes metabolitos.

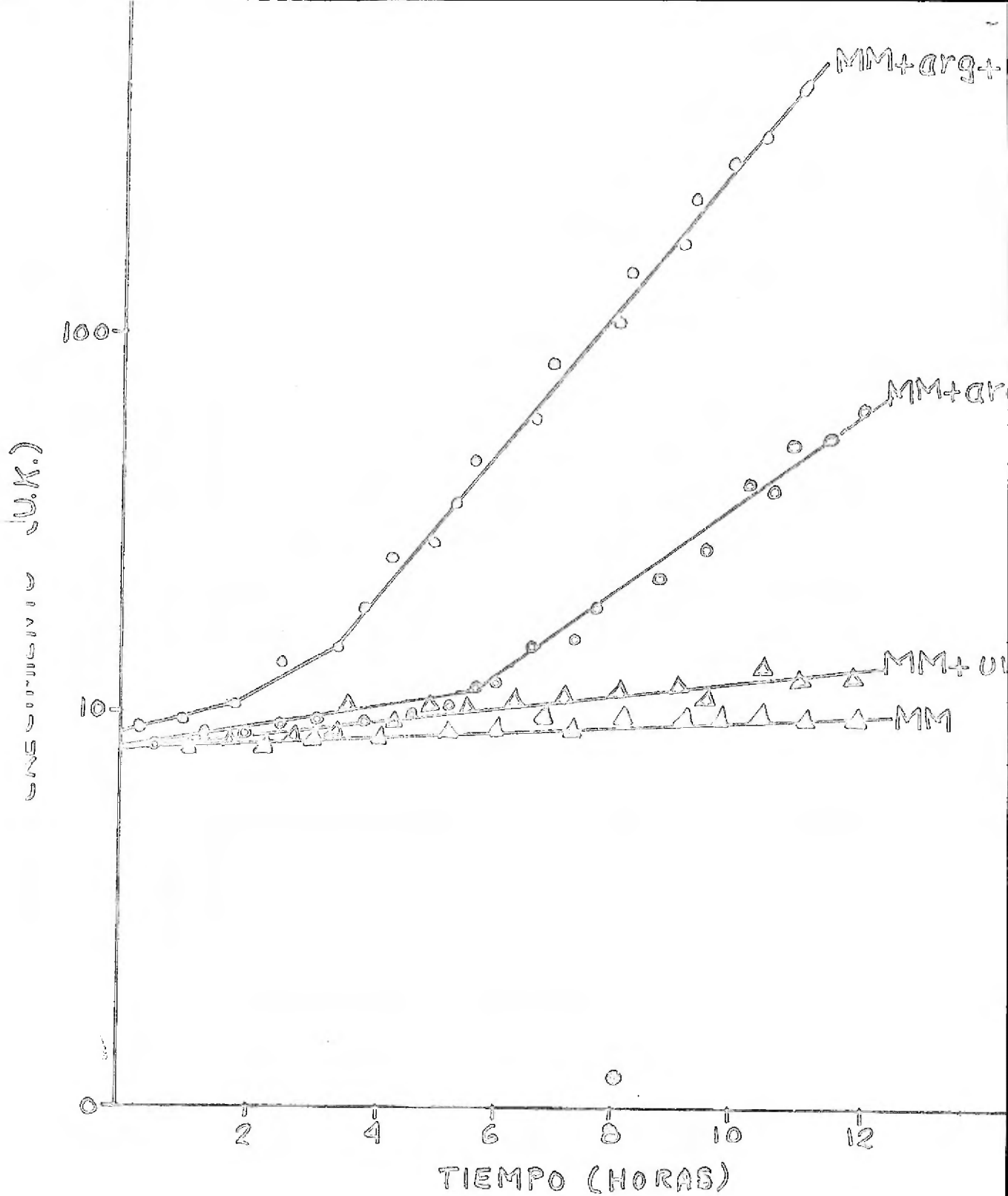


Fig. Num. 9.- Curva de crecimiento de la cepa JM 407 pyr B⁻ en medio mínimo suplementado con diferentes metabolitos.

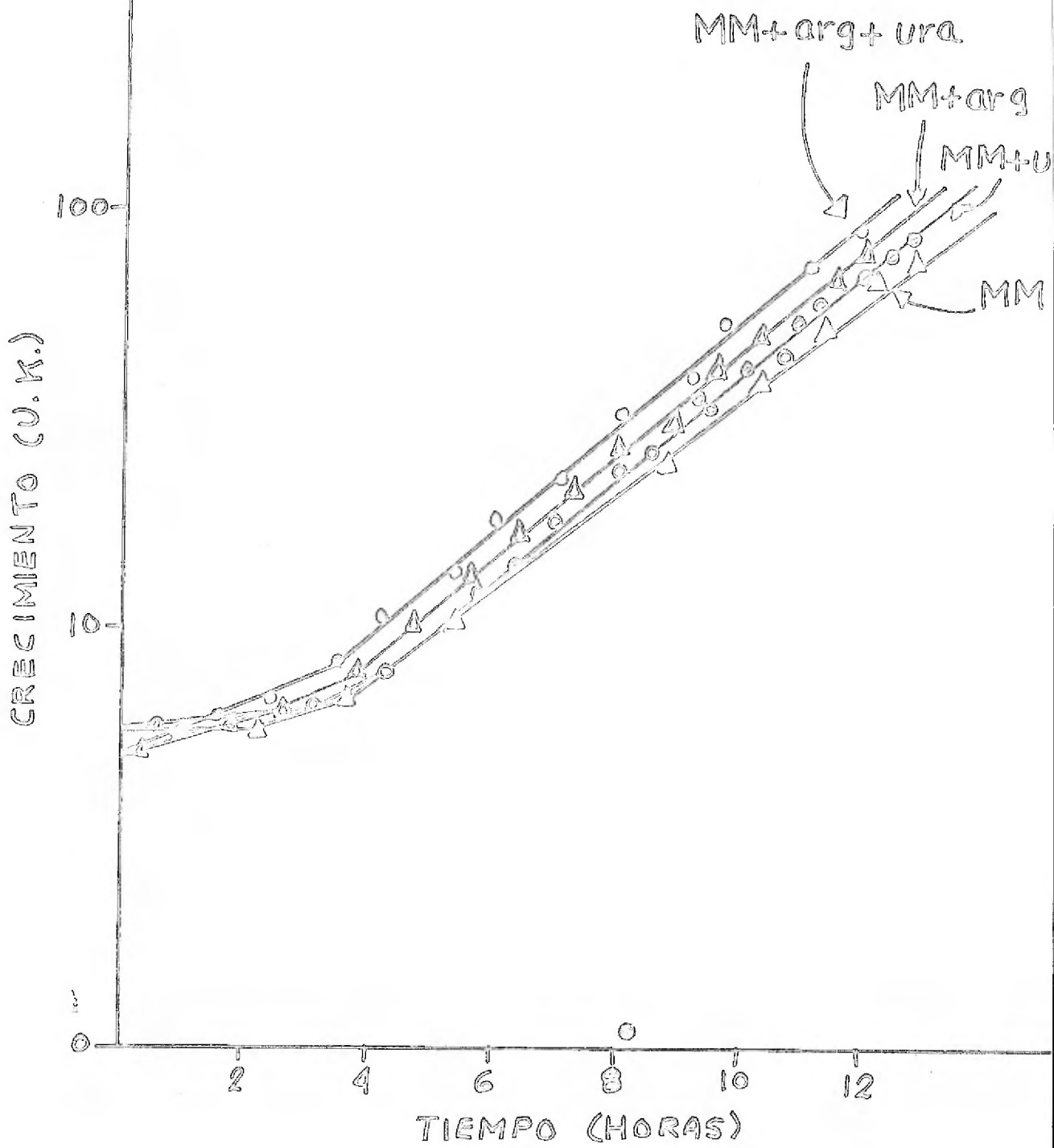


Fig. Num. 10.- Curva de crecimiento de la cepa JM 414 pyr A₁₃ :: (Mu⁺) pyr A⁺ en medio mínimo suplementado con diferentes metabolitos.

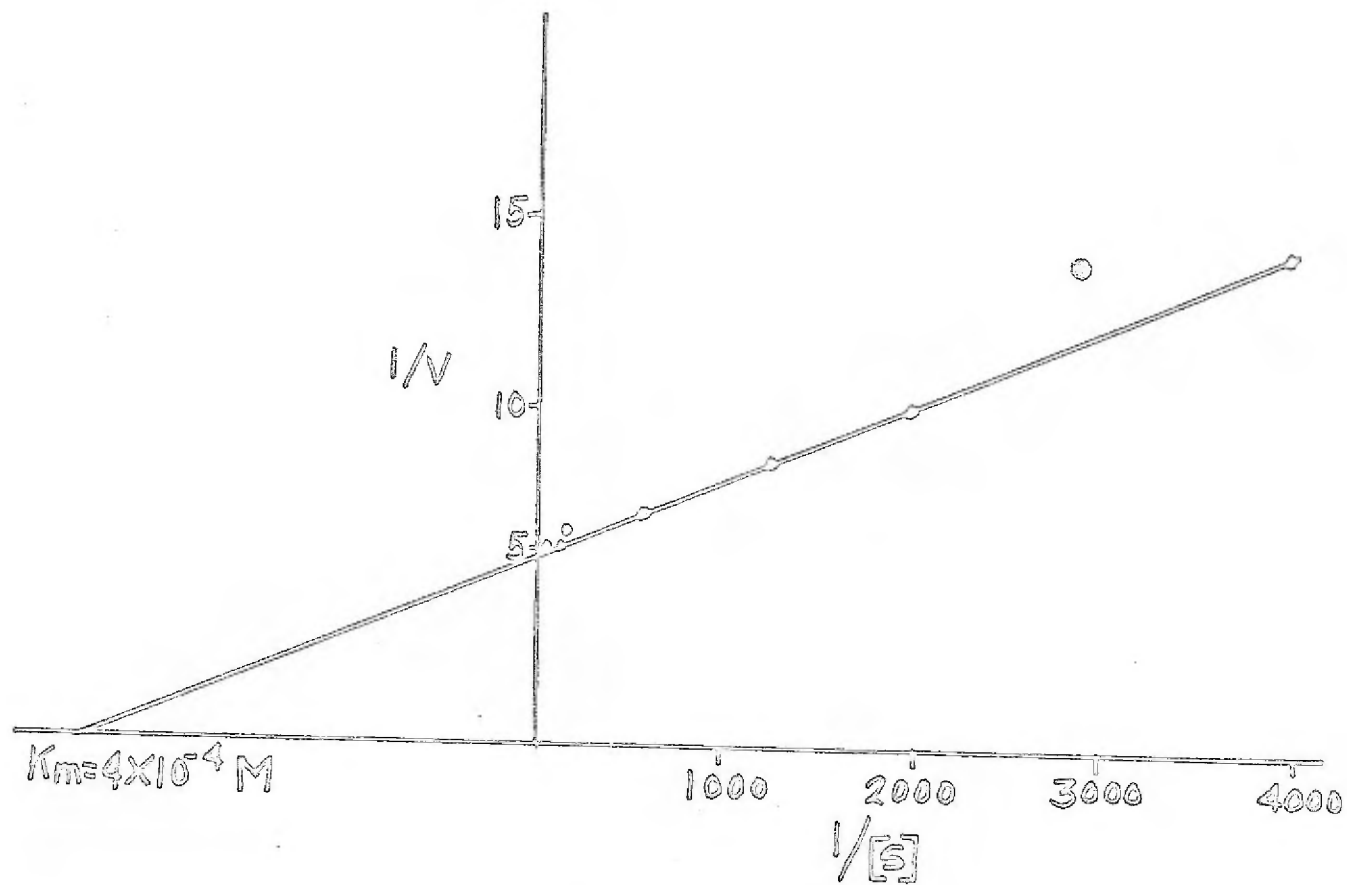


Fig. No. 11.- Curva contra sustrato (glutamina) de CPS extraída de la cepa JM 46

$V = \mu$ molas de CP / 10' / 0.7 mg. prot.

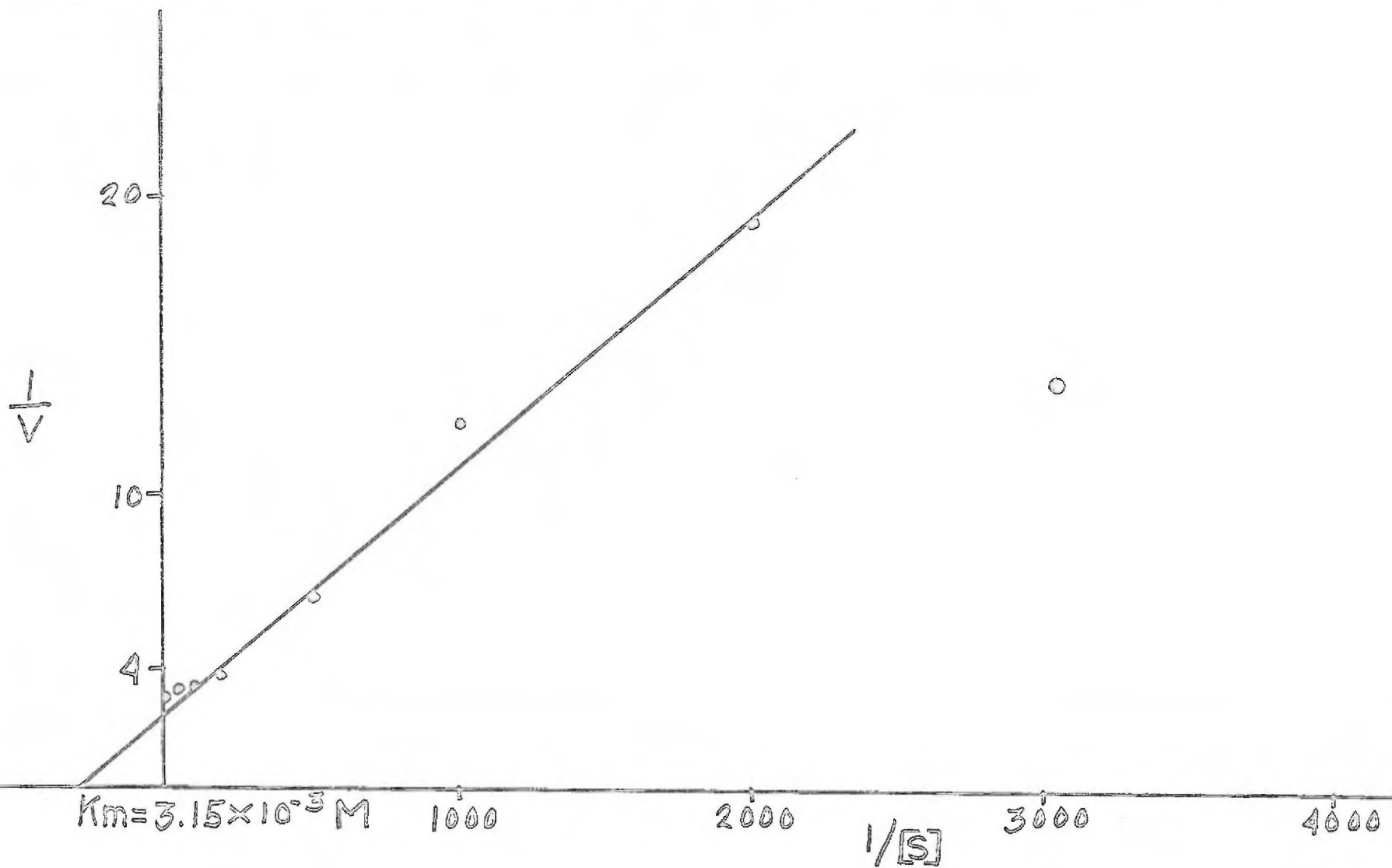


Fig. Num. 12.- Curva contra sustrato (HCO_3^-) de CPS extraída de la cepa JM 46

$V = \mu$ molas CP / 10' / 1.05 mg. prot.

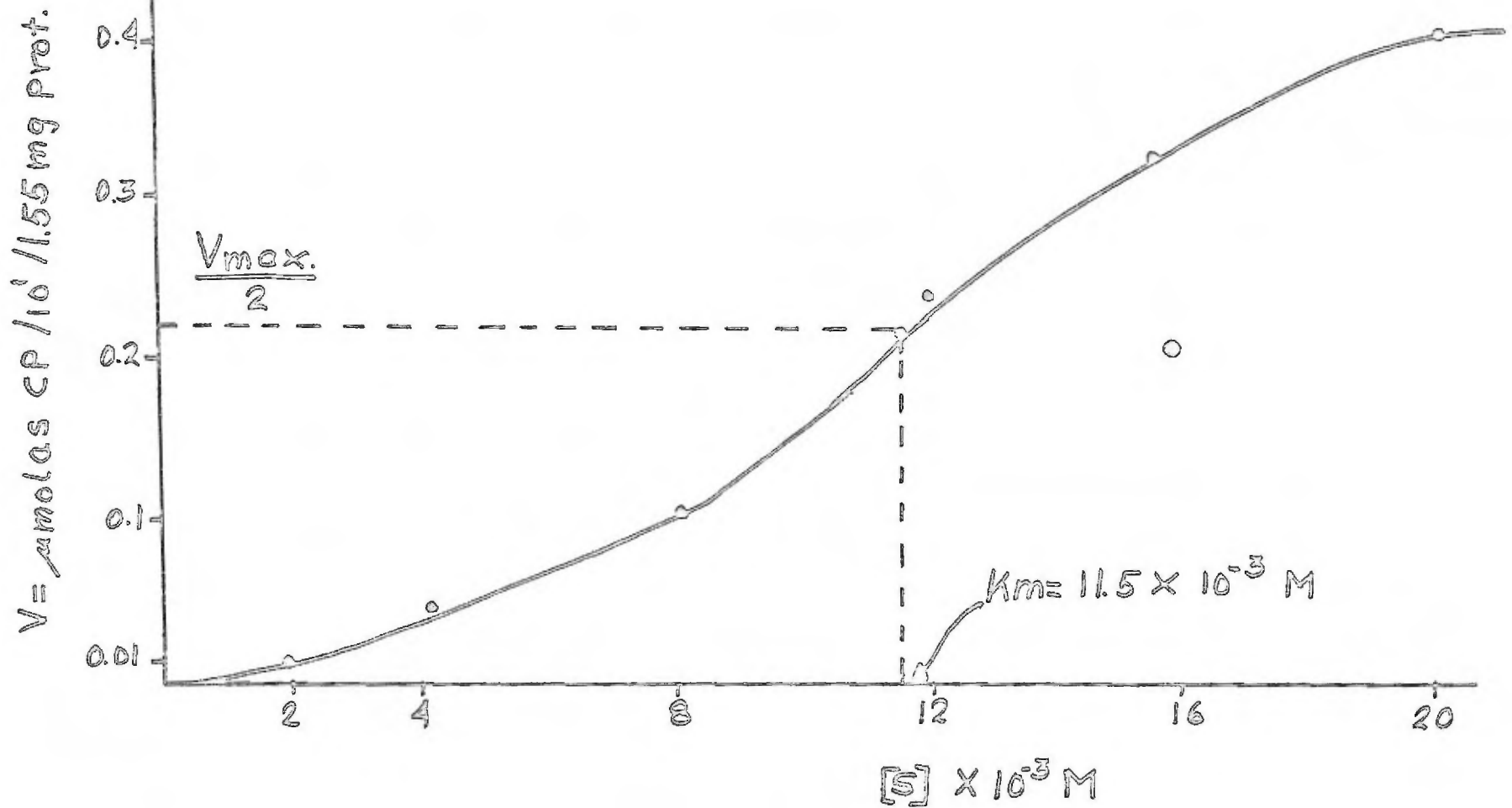


Fig. Num. 13.- Curva contra sustrato (ATP) de CPS extraída de la cepa JM 46

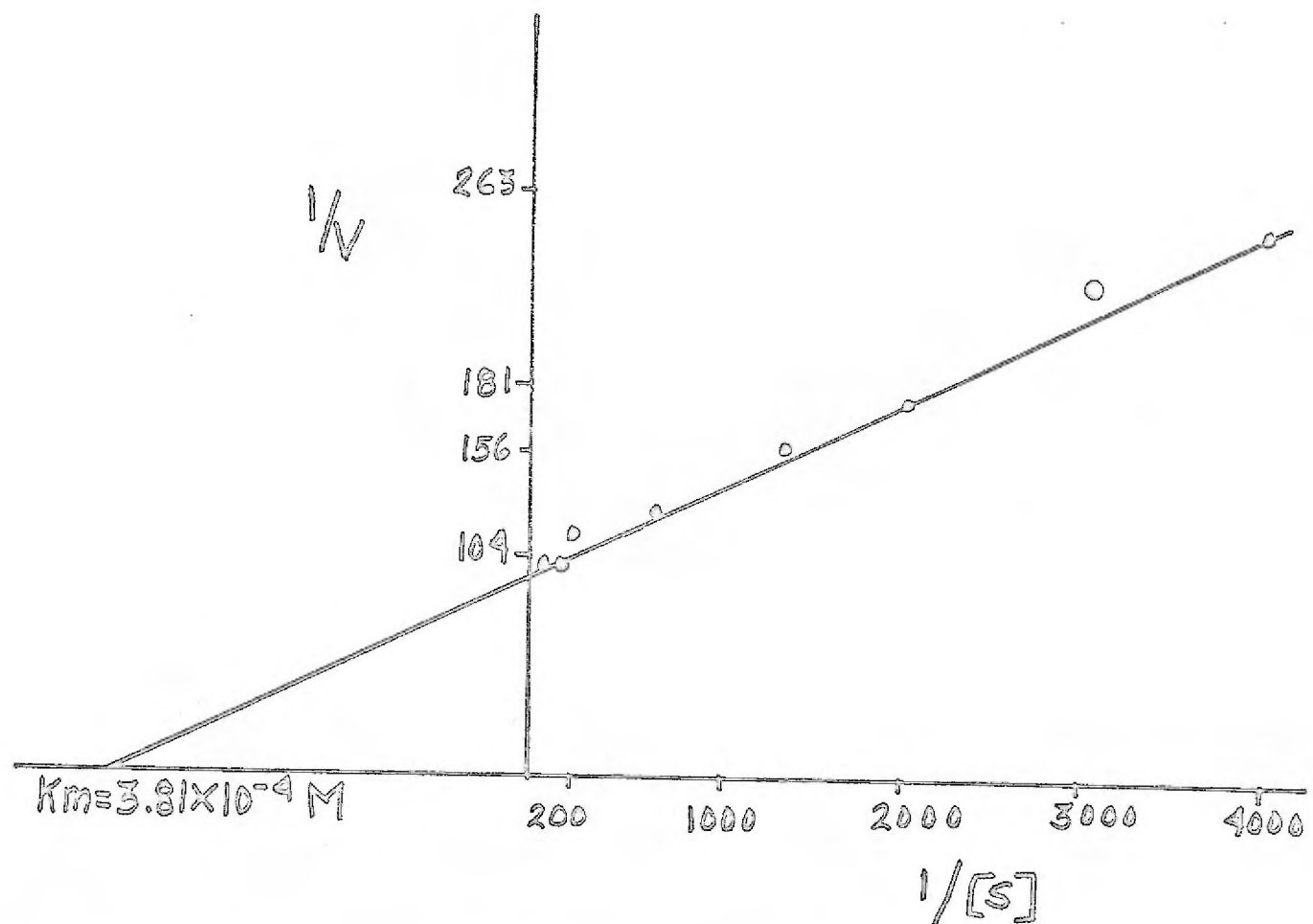


Fig. Num. 14.- Curva contra sustrato (Glutamina) de CPS extraída de la cepa JM 89

pyr A₁₃

V = μ molas CP/ 10' / .71 mg. prot.

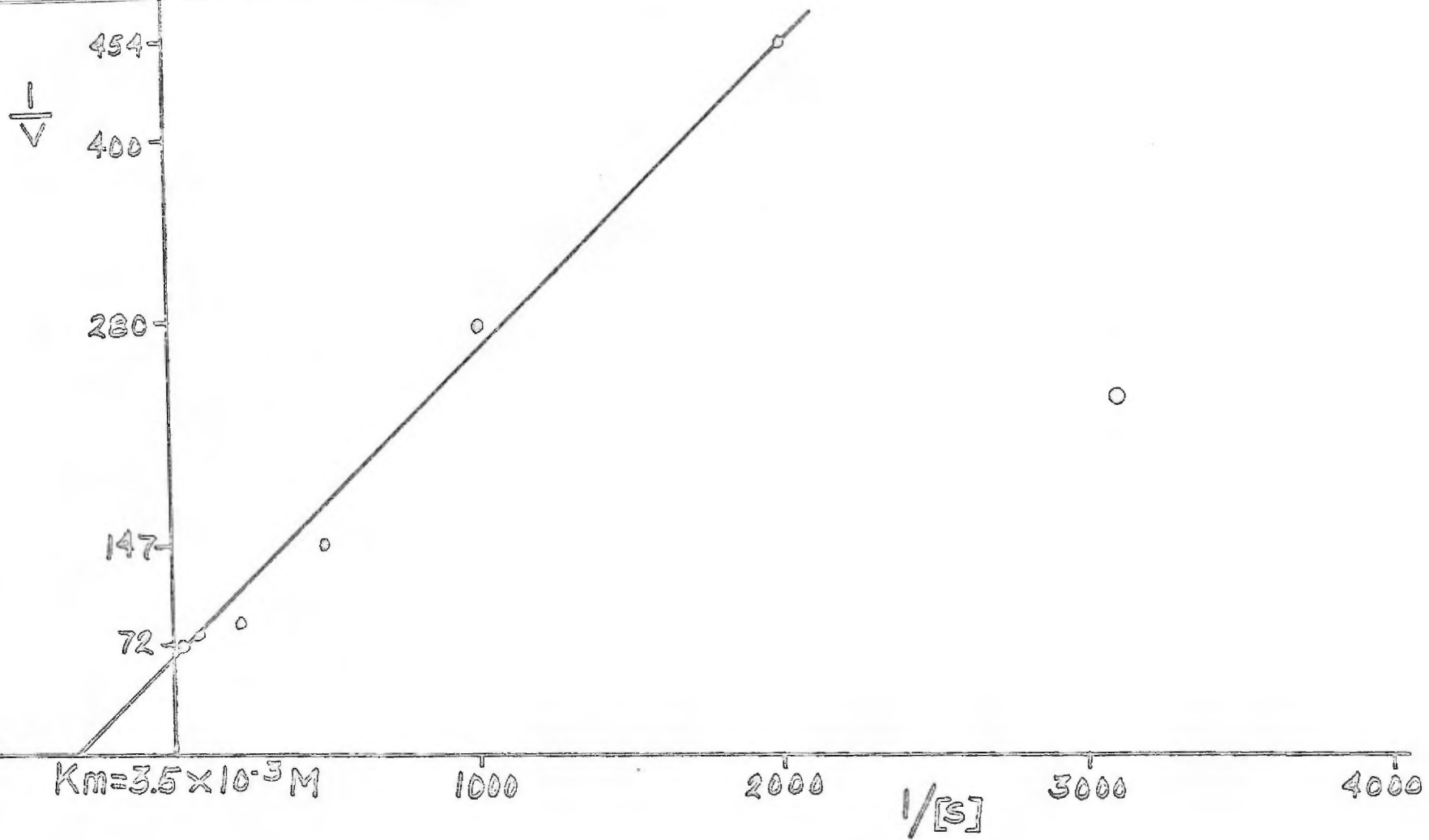


Fig. Num. 15.- Curva contra sustrato (HCO_3^-) de CPS extraída de la cepa JM 89 pyr A₁₃

$$V = \mu \text{ molas CP} / 10' / 1.05 \text{ mg. prot.}$$

$V = \mu\text{molas CP} / 10' / 1.55 \text{ mg prot.}$

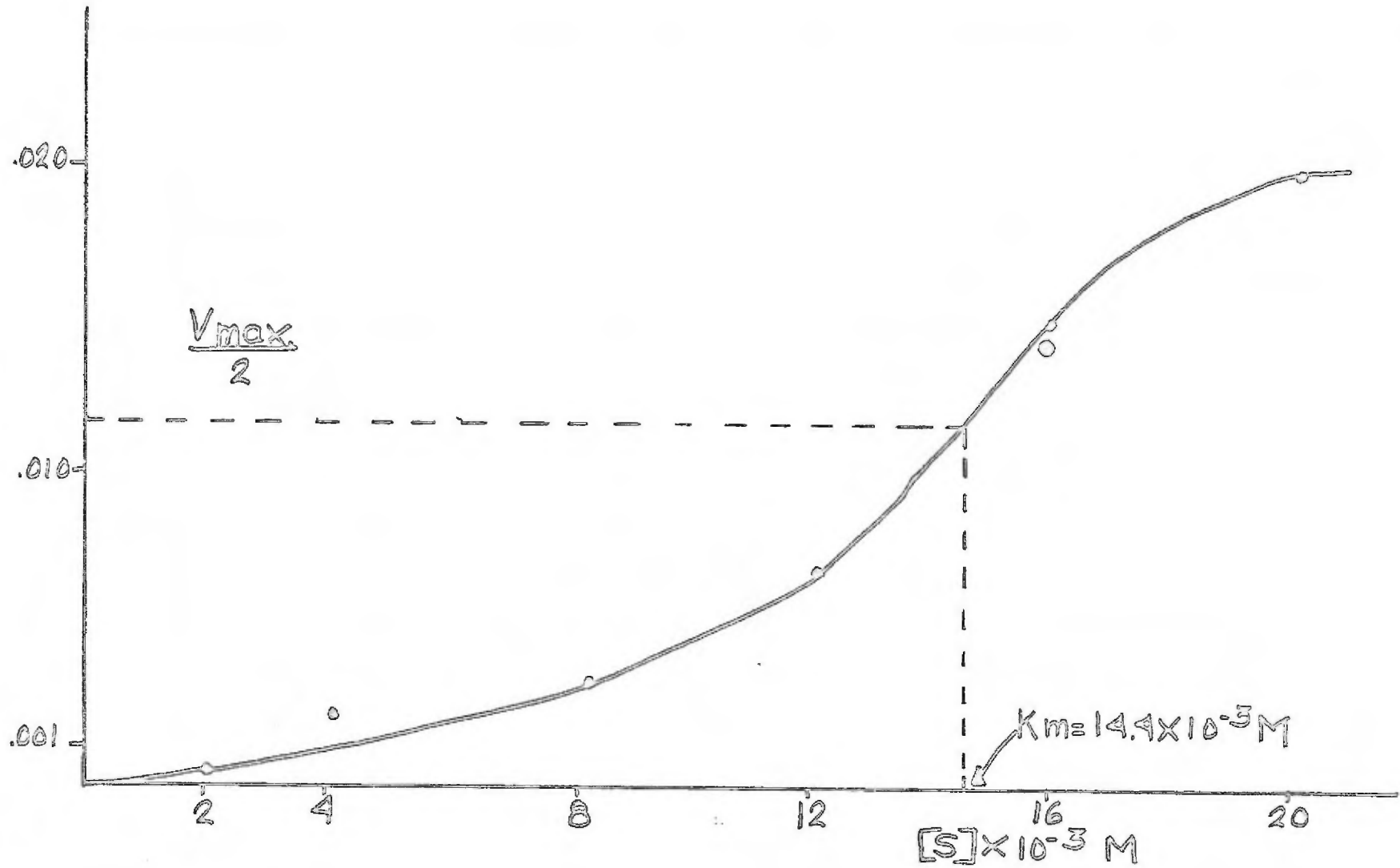


Fig. Num. 16.- Curva contra sustrato (ATP) de CPS extraída de la cepa JM 89.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A.- Caracterización del alelo pyr A₁₃.

a).- Mapeo del alelo pyr A₁₃.- Según Taylor y Trotter (28), el gene pyr A mapea al minuto 0.6 del cromosoma de E. coli y presenta frecuencias de cotransducción de 25-40 % con el gene thr C, que mapea al minuto 0, y de 10% con el gene leu B, que mapea al minuto 1.25. Sin embargo, estas frecuencias disminuyen cuando el genoma de Mu-1 está insertado en el gene pyr A, siendo, en este caso, la frecuencia de cotransducción con el gene thr C de 0.5 % y con leu B no se detectan cotransductantes.

Usando el bacteriofago P₁ como fago transductante, crecido sobre la JM 89 pyr A₁₃, e infectando con éste a la cepa JM 18 thr⁻ leu⁻, se obtuvo una frecuencia de cotransducción de 0.4 % con thr y no detectándose cotransductantes con leu.

Por otro lado, se comprobó que las recombinantes de la cepa JM 18 que heredaban el marcador de auxotrofia para arginina (el alelo pyr A₁₃), en todos los casos presentaban lisogenia para el fago Mu-1.

De estos datos se deduce que la mutación se localiza en el gene pyr A y que está producida por el fago Mu-1.

b).- Se han reportado con anterioridad diferentes fenotipos resultantes de mutaciones en el gene pyr A, como los reportados por Abd-El-Al e Ingraham (2) y Abd-El-Al et al. (3), en S. typhimurium y E. coli B, como se muestra en la tabla No. 10; y Piérard et al. (23) que describen mutantes hipersensibles a UMP.

B.- Posible canalización del carbamil fosfato hacia la vía de pirimidinas

a).- De acuerdo con el hecho de que los niveles de OTC sean análogos tanto en la cepa silvestre (JM 46) como en la cepa mutante (JM 89), como se muestra en la tabla No. 1, aunado al hecho de que la actividad de la

FENOTIPO	ORGANISMO	CRECIMIENTO EN				GENOTIPO
		MM	MM + ARG	MM + URA	MM + ARG + URA	
Doble auxótrofo	<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	+	pyr A
	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	pyr A
Sensible a arginina	<i>S. typhimurium</i>	+	-	+	+ ₀	arg
Sensible a uracilo	<i>S. typhimurium</i>	+	+	-	+	urs
	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	
Auxotrofo de arginina	<i>E. coli</i>	-	+	-	+	
Sensible a 37°	<i>S. typhimurium</i>	+	+	+	+	
Sensible a 20°		-	+	-	+	

Tabla Num. 10.- Fenotipos resultantes de mutaciones en el gene pyr A (2,3).

CPS, aunque presente en la mutante, está sensiblemente disminuída (tabla Num. 3), y de acuerdo con el patrón de crecimiento de ambas cepas (Figs. 6 y 7), se ha pensado en una canalización del CP sintetizado hacia la -- vía de pirimidinas.

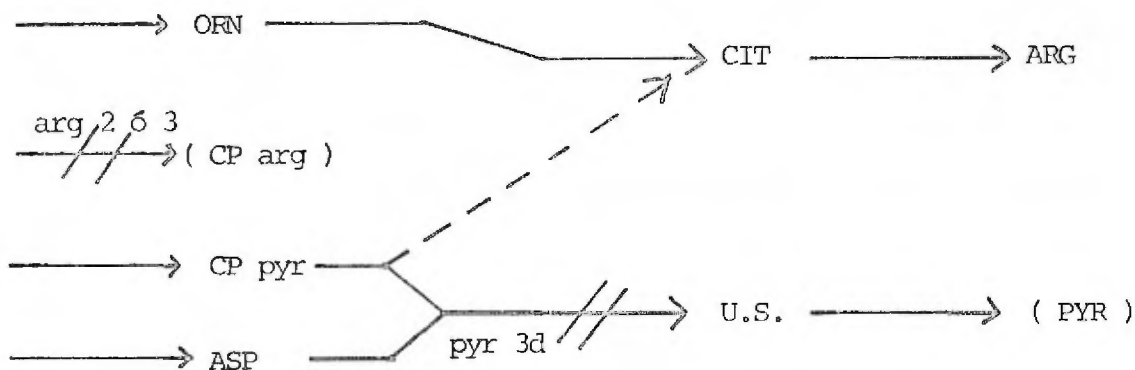
Ong y Jackson (21), han reportado que en la planta Phaseolus aureus, la cual sintetiza carbamil fosfato por una sola enzima, utiliza preferen- temente el CP para la vía de pirimidinas, cuando este CP se encuentra presente en bajas concentraciones intracelulares, dependiendo de la con- centración de efectores alostéricos. Cuando la concentración de CP au- menta, debido tal vez a una estimulación de la actividad de la CPS por la ornitina, este CP puede ser utilizado para la biosíntesis de arginina.

A la fecha sólo se ha reportado un caso de canalización de carbamil fosfato, bajo ciertas condiciones metabólicas, por R.H. Davis (11) en - Neurospora crassa. En este organismo existen dos CPS, una cuyo producto es usado preferentemente para la biosíntesis de arginina (CPS arg) y la otra cuyo producto es usado para la síntesis de pirimidinas (CPS pyr). Como - puede verse en la Fig. No. 17, el bloqueo de ciertas enzimas produce una canalización del carbamil fosfato de una vía metabólica hacia la otra.

b).- Para corroborar la idea de canalización, se pensó en construir una cepa que tuviera, además de la mutación en el gene pyr A (que codifi- ca para la CPS), una mutación en el gene pyr B (que codifica para la ATC), mutación que bloquearía el camino de pirimidinas y permitiría que el CP sintetizado se canalizara para la vía de arginina.

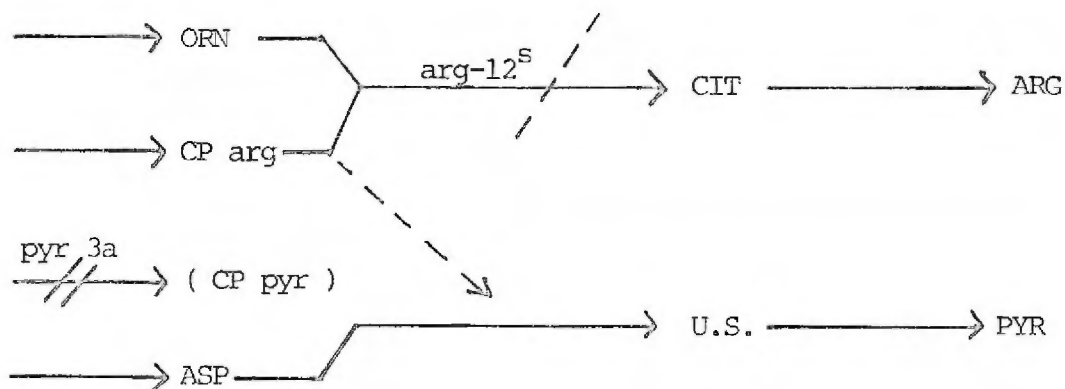
Como puede verse en resultados, se logró la construcción de esta cepa (la JM 406), y al observar el patrón de crecimiento de la misma (Fig.No.8) se ve que ya no necesita arginina para crecer y sí uracilo.

Esto nos habla de una canalización del carbamil fosfato hacia la vía de arginina.



arg-2, pyr-3d ó arg-3, pyr-3d

No requiere arginina.



pyr-3a, arg-12^S

No requiere uracilo.

○

Fig. No. 17.- Diagrama superior: ruta del metabolismo de CP en dobles mutantes arg-2, pyr 3d y arg-3, pyr 3d.

Diagrama inferior: ruta del metabolismo de CP en la doble mutante pyr 3a, arg-12^S.

Notaciones: // = bloqueo completo. ./ = bloqueo incompleto.

() = compuestos no sintetizados.

C.- Dominancia o recesividad del alelo pyr A₁₃.

a).- Con el propósito de determinar si el alelo pyr A₁₃ es dominante ó recesivo con respecto del alelo pyr A silvestre, se pensó, en construir una cepa en la cual estuvieran presentes tanto el alelo silvestre como el pyr - A₁₃, ya que éste codifica para una proteína que es responsable de un 6% de la actividad de la CPS de una cepa prototrofa.

b).- Como puede verse en resultados, se logró la construcción de esta cepa merodiploide (JM 414) mediante una serie de experimentos.

En la Fig. No. 10 se muestra el patrón de crecimiento de esta cepa (JM 414), siendo semejante al de la cepa normal, lo que indica una dominancia - del alelo silvestre sobre el alelo pyr A₁₃.

En la tabla Num. 5 se ilustran los niveles de actividad de la CPS de la cepa merodiploide en comparación con la cepa silvestre y la mutante pyr A₁₃. Como se observa en la tabla, la actividad de la CPS de la merodiploide es - la suma de las actividades de las CPS de las otras dos células, lo cual nos habla de un efecto aditivo y por lo tanto, no hay dominancia de ninguno de los dos alelos.

D.- Propiedades de la CPS codificada por el alelo pyr A₁₃.

En vista de las características especiales de la CPS codificada por el alelo pyr A₁₃, se decidió estudiar algunas de sus propiedades comparativamente con la CPS silvestre.

a).- Ausencia de inhibidores para la CPS en la cepa JM 89.- Se midió la actividad de CPS de una mezcla a iguales concentraciones de proteínas de las cepas JM 46 y JM 89. En la tabla No. 4 puede verse que la actividad resultante es la suma de ambas actividades. Con este dato y con el de actividad de CPS en la merodiploide (tabla No. 5), podemos concluir que la actividad residual en la cepa JM 89 no se debe a la presencia de un inhibidor de

la actividad de la CPS.

b).- Utilización de NH_4Cl como fuente de nitrógeno.- Como se ha mencionado antes, Kalman et al. (16) y posteriormente Anderson y Marvin (6), demostraron que el NH_4Cl puede ser usado por la CPS como fuente de nitrógeno en vez de glutamina, aunque la Km es 200 veces mayor para el NH_4Cl . Es por esto que se usaron 100 molas totales de NH_4Cl por mililitro de reacción y 10 molas de glutamina.

Como se muestra en la tabla No. 6, tanto la CPS silvestre como la codificada por el alelo pyr A₁₃ pueden usar NH_4Cl como fuente de nitrógeno, aparentemente con igual eficiencia.

c).- Efecto de los moduladores alostéricos UMP y Ornitina sobre la actividad de la CPS.- Se ha reportado que la actividad de la CPS está parcialmente retroinhibida por UMP, siendo esta retroinhibición antagonizada por la ornitina (4, 7, 23, 24), y que ésta última por sí sola, activa la enzima, siendo la ornitina un efector alostérico positivo, mientras que el UMP es un efector alostérico negativo (4).

Con objeto de conocer el efecto que estos moduladores ejercían sobre la CPS codificada por el alelo pyr A₁₃ en comparación con la CPS silvestre, se procedió a medir sus actividades en presencia de UMP, UMP + Ornitina y Ornitina, siguiendo los métodos de Piérard (24) y Anderson y Meister (6). Los resultados se muestran en la tabla No. 7. Como puede observarse el UMP y la Ornitina ejercen acción similar en ambas enzimas y estos resultados: inhibición por UMP (7), efecto de ornitina sobre inhibición por UMP (24) y activación por ornitina (21,24) están de acuerdo con lo reportado.

d).- Estabilidad de la CPS codificada por pyr A₁₃.- Se ha reportado que la CPS de E. coli es estable a pH 5, en glicerol al 20 % y a -15°C (16). De acuerdo con esto, se trataron ambas enzimas, la silvestre y la codificada por pyr A₁₃ en las condiciones anteriores y se midió su activi

dad a los 0, 5 y 9 días, anotándose los resultados en la tabla No. 8. Como puede verse, la estabilidad de la CPS de la cepa silvestre está de acuerdo con lo reportado, mientras que la actividad de la CPS de la JM 89 desaparece en función del tiempo.

e).- Determinación de las Km aparentes de los tres sustratos de la CPS: glutamina, ATP y HCO_3^- .- Se determinaron las constantes de Michaelis para los tres sustratos, en ambas cepas. Como puede verse en las Figs. No. 11, 12, 13, 14, 15 y 16, los valores obtenidos para los sustratos de la CPS codificada por pyr A₁₃ son análogos a los obtenidos para la CPS silvestre, lo cual nos habla de que el sitio activo no está modificado en la CPS codificada por pyr A₁₃.

f).- Intentos de purificación de la CPS de la cepa JM 89.- Según el método de Anderson y Meister (6), se intentó purificar la CPS codificada por pyr A₁₃ y la CPS silvestre, consistiendo este método en los siguientes pasos: desnaturalización por calor, sulfato de protamina, precipitación con sulfato de amonio, gel de fosfato de calcio, DPAE celulosa y Sephadex G - 200.

Sólo se siguieron los primeros tres pasos, partiendo en cada uno del extracto crudo de ambas cepas. Los resultados anotados en la tabla No. 9 nos indican que la CPS codificada por pyr A₁₃ no es estable bajo estas condiciones, por lo que se intentará montar las condiciones adecuadas para su purificación.

CONCLUSIONES

Se han reportado algunos datos que hablan de una canalización del carbamil fosfato en P. aureus (21) y N. crassa (11).

Se ha dicho que en condiciones metabólicas especiales, la vía de biosíntesis de pirimidinas tiene preferencia en la utilización del CP (especial

mente a bajas concentraciones de CP) sobre la vía de biosíntesis de arginina. Cuando existe una concentración alta de CP debida a una activación de la CPS por altas concentraciones de ornitina, el CP es asequible para la vía de biosíntesis de arginina. Estos datos están reforzados por los valores de las constantes de Michaelis para CP de la OTC y ATC, siendo, tanto en P. aureus como en E. coli, mayor la de la OTC que la de la ATC (27,25), y nos habla de un mecanismo de regulación por el cual la arginina regula su propia biosíntesis sin retroinhibir la CPS.

Cuando hay un exceso de arginina, ésta retroinhibe la N^o-acetil-glutamico-sintetasa, disminuyendo así la síntesis de ornitina. Cuando no hay ornitina que active la CPS, se sintetiza menor cantidad de carbamil fosfato y -- probablemente es utilizado únicamente para la biosíntesis de pirimidinas.

Este mecanismo lo podríamos aplicar a la cepa JM 89, ya que en ella, el CP que se sintetiza es utilizado por la vía de biosíntesis de pirimidinas. Cuando se acumula CP por una mutación en el gene pyr B (que codifica para la ATC), la cepa ya no requiere arginina para crecer.

Ahora bien, cuando el genoma de Mu-1 se inserta en el cromosoma de E. coli, suprime la expresión fenotípica de los genes huéspedes localizados en el sitio de integración (27).

En el caso de la cepa JM 89, la inserción de Mu-1 en el gene pyr A no ha provocado la supresión completa de la actividad de la enzima codificada por dicho gene, a diferencia de todas las otras mutantes de CPS producidas por Mu-1 reportadas hasta hoy.

Para explicar este interesante fenómeno, se proponen varios modelos a saber:

a).- La inserción del cromosoma de Mu-1 se efectuó en el extremo de uno de los polipéptidos que aparentemente integran la CPS (5), dando como resultado un polipéptido de menor tamaño, el cual es capaz de ensamblarse, pero

con menor eficiencia que el polipéptido normal, lo cual integraría una CPS con menor actividad enzimática.

Sin embargo, todas las características de la enzima codificada por pyr A₁₃ por lo que respecta a utilización de NH₄Cl como fuente de nitrógeno, - efectos de los moduladores alostéricos, Km de los sustratos, etc., no varían en comparación con la enzima silvestre.

b).- Otro dato importante es el hecho de que las constantes de Michaelis para los tres sustratos de la CPS sean iguales tanto para la enzima silvestre como para la codificada por pyr A₁₃.

Esto hace pensar en un modelo en el cual la mutación producida por la inserción de Mu-1 tuviera como resultado que no se sintetizara un polipéptido capaz de aumentar la eficiencia de la catálisis de la CPS, es decir, sin este polipéptido sí hay catálisis, pero con una eficiencia mucho menor, como es el 6 % que se observa, y que en este polipéptido no existe ni sitio activo ni sitio alostérico, con lo cual se podría explicar que las otras propiedades no estén modificadas.

c).- Otra posibilidad sería que este polipéptido fuera un "transportador", que tuviera como función llevar la CPS intracelularmente al sitio fisiológico adecuado, de manera que sin esta función, la CPS, aunque normal, no puede verter su producto adecuadamente.

○

Como puede verse por los datos presentados en el presente trabajo, las características de esta mutante la hacen muy interesante y por ello se ha pensado en montar las condiciones adecuadas para la purificación de la CPS codificada por pyr A₁₃, así como también calcular su peso molecular, caracterización de subunidades en geles de acrilamida (SDS), centrifugación en presencia de efectores alostéricos, efecto de inhibidores, localización intracelular de la enzima por técnicas histoquímicas, etc., lo que vendría a formar parte de un trabajo posterior.

GLOSARIO

- Alelo.**- Una de las dos ó más formas alternadas de un gene.
- Auxotrofo.**- Organismo cuyos requerimientos para el desarrollo difieren de los de la cepa progenitora ó prototipo (Especialmente referido a mutantes).
- Camino metabólico.**- Serie consecutiva de reacciones enzimáticas intracelulares que convierte una molécula en otra.
- Delección.**- Pérdida de una sección del material genético del cromosoma. El tamaño de la delección puede variar de un sólo nucleótido a secciones que contengan un número de genes.
- Diploidía.**- Estado cromosomal en el cual cada tipo de cromosoma, excepto los sexuales, está representado siempre dos veces ($2N$).
- Entrecruzamiento.**- Proceso de intercambio de material genético entre cromosomas homólogos.
- Episomas.**- Elementos genéticos que pueden existir tanto libres, como formando parte del cromosoma celular normal.
- Factor de la fertilidad (F^+).**- Episoma que determina el sexo de una bacteria. La presencia de este factor en la célula da el carácter de macho. (Las células hembras son F^-).
- Fenotipo.**- Propiedades observables de un organismo. Producido por el genotipo en cooperación con las circunstancias externas.
- Gene tipo silvestre.**- La forma del gene (alelo) que se encuentra comunmente en la naturaleza.
- Genotipo.**- Constitución genética de un organismo. (La cual se distingue de su apariencia física ó fenotipo).
- Hfr (Alta frecuencia de recombinación).**- Cepas de E. coli las cuales muestran altas frecuencias de recombinación nada comunes. En estas células, el factor F está integrado en el cromosoma bacteriano, donde se cree que juega un papel en la transferencia del cromosoma.

soma de células Hfr a células F^- .

Mapa genético.- Arreglo ó acomodamiento de sitios mutables en un cromosoma, tal como se deduce de experimentos de recombinación genética.

Merodiploide.- Célula que presenta diploidía en una parte de su cromosoma.

Mutación.- Cambio hereditario en un cromosoma.

Mutágeno.- Agentes físicos ó químicos, tales como radiación, calor, agentes alcalinizantes, etc., los cuales elevan la frecuencia de mutación muy por encima del nivel de mutación espontánea.

Placas.- Areas circulares, claras, en una capa celular confluyente las cuales resultan de la muerte o lisis de células contiguas por varios ciclos de crecimiento viral.

Prototrofo.- Organismo que obtiene su nutrición de sustancias inorgánicas. (Células capaces de crecer en un medio mínimo).

Recombinación.- Aparición, en la progenie, de caracteres que no se encuentran juntos en ninguno de los padres.

Retroinhibición.- Inhibición de la actividad enzimática de la primera enzima en un camino metabólico, por el producto final de dicho camino.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abd-El-Al, A. and Ingraham, J. L.
"Control of carbamyl phosphate synthesis in Salmonella typhimurium".
J. Biol. Chem. 244, 4033 (1969).
- 2.- Abd-El-Al, A. and Ingraham, J.L.
"Cold sensitivity and other phenotypes resulting from mutation in pyr A gene".
J. Biol. Chem. 244 , 4039 (1969)
- 3.- Abd-El-Al, A., Kessler, D. P. and Ingraham, J.L.
"Arginine auxotrophic phenotypes resulting from a mutation in a pyr A gene of E. coli B / r ".
J. Bacteriol. 97 , 466 (1969).
- 4.- Anderson, P. M. and Marvin, S.V.
"Effect of ornithine, IMP and UMP on carbamyl phosphate synthetase from E. coli".
Biochem. Biophys. Res. Comm. 32 , 928 (1968).
- 5.- Anderson, P.M. , Mathews, S.L. and Foley, R.E.
"Evidence for the presence of non identical subunit in CPS ase".
Fed. Proc. 29 , 867 abs. (1970).
- 6.- Anderson, P.M. and Meister, A.
"Evidence for an activated form of carbon dioxide in the reaction catalized by Escherichia coli carbamyl phosphate synthetase".
Biochemistry 4 , 2803 (1965).
- 7.- Anderson, P.M. and Meister, A.
"Control of Escherichia coli carbamyl phosphate synthetase by -- purine and pyrimidine nucleotides".
Biochemistry 5 , 3164 (1966).

- 8.- Bastarrachea, F. and Ortega, V. M.
 "Biosynthesis of ornithine transcarbamylase in Escherichia coli
 during phenotypic suppression by streptomycin".
 Biochim. Biophys. Acta 138 , 151 (1967).
- 9.- Bukhari, A.J. and Zipser, D.
 "Random insertion of Mu-1 DNA within a single gene".
 Nat. New Biol. 236 , 240 (1972).
- 10.-Campbell, A.
 "Episomes"
 Harper & Row Publ. New York (1969).
- 11.-Davis, R. H.
 "Channeling in Neurospora metabolism".
 Genetics 47 , 351 (1962).
- 12.-Eisenstark, A
 "Structure of mutator phage Mu-1 of E. coli".
 J. Ultrastructure Res. 14 , 441 (1966).
- 13.-Hunninghake, D. and Grisolia, S.
 "A sensitive and convenient micromethod for estimation of urea,
 citrulline and carbamyl derivatives".
 Anal. Biochem. 16 , 200 (1966).
- 14.-Ikeda, H. ○
 "Prophage P₁, an extrachromosomal replication unit".
 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 , 141 (1968).
- 15.-Jacob, F. and Wollman, E.
 "Sexuality and the genetics of bacteria".
 Academic Press. New York (1961).

- 16.- Kalman, S.M., Duffield, P.M. and Brzozowski, T.
"Purification and properties of a bacterial carbamyl phosphate synthetase".
J. Biol. Chem. 241 , 1871 (1966).
- 17.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.
"Protein measurement with the Folin-phenol reagent".
J. Biol. Chem. 193 , 265 (1951).
- 18.- Luria, S. E. and Darnell, S.
"General Virology"
John Wiley & Sons. New York (1967).
- 19.- Martuscelli, J., Taylor, A.L., Cumming, D.L., Chapman, V.A.,
De Long, S.S. and Cañedo, L.
"Electron microscopy evidence for linear insertion of bacteriophage Mu-1 in lysogenic bacteria".
J. Virology 8 , 551 (1971).
- 20.- Ming-Ta-Hsu and Davidson, N.
"Structure of inserted bacteriophage Mu-1 DNA and physical mapping of bacterial genes by Mu-1 DNA insertion".
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69 , 2823 (1972).
- 21.- Ong, B.L. and Jackson, J.F.
"Pyrimidine nucleotide biosynthesis in Phaseolus aureus".
Biochem. J. 129 , 583 (1972).
- 22.- Piérard, A. and Wiame, J.M.
"Regulation and mutation affecting a glutamine dependent formation of carbamyl phosphate in Escherichia coli".
Biochem. Biophys. Res. Comm. 15 , 76 (1964).
- 23.- Piérar, A., Glansdorff, N., Mergeay, M. and Wiame, J.M.
"Control of the biosynthesis of carbamyl phosphate in E. coli".
J. Mol. Biol. 14 , 23 (1965).

24.- Piérard, A.
 "Control of the activity of E. coli carbamyl phosphate synthetase by antagonistic allosteric effectors".
 Science 154 , 1572 (1966).

25.- Porter, R.W., Modebe, M.O. and Starch, D.R.
 "Aspartate transcarbamylase; kinetic studies of the catalytic subunit".
 J. Biol. Chem. 244 , 1846 (1969).

26.- Rogers, P. and Novelli, G.D.
 "Purification of ornithine transcarbamylase from derepressed cells of Escherichia coli W".
 Arch. Biochem. Biophys. 92 , 398 (1962).

27.- Taylor, A.L.
 "Bacteriophage induced mutation in E. coli".
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 50 , 1043 (1963).

28.- Taylor, A.L. and Trotter, C.D.
 "Linkage map of Escherichia coli strain K-12".
 Bacte. Rev. 36 , 504 (1972)).

29.- Torti, F., Barksdale, C. and Abelson, J.
 "Mu-1 bacteriophage DNA"
 Virology 41 , 567 (1970). ○

30.- Zinder, M. and Lederberg, J.
 "Genetic exchange in Salmonella"
 J. Bacteriol. 64 , 679 (1952).