

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
TESIS

**Controles de las Etapas  
Intermedias del Desarrollo  
del Bacteriofago S P O 1**

ALBERTO NICASIO SARACHU

1 9 7 8

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas (Orientación Bioquímica Clínica) ha sido realizado en el Laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas, bajo la dirección del Profesor Doctor Oscar Grau.



**Mi reconocimiento**

a la Comisión de Investigación Científica de la Universidad Nacional de La Plata y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas otorgadas en su oportunidad

a la Facultad de Ciencias Exactas por los recursos que ha insumido la realización de este trabajo.

**Mi agradecimiento**

al Doctor Oscar Grau por brindarme la posibilidad de iniciarme en la investigación científica, por proporcionar el tema de trabajo y por su dirección y permanente apoyo científico y humano durante el desarrollo experimental y la escritura del mismo

a los Doctores M. C. Añón y G. Favelukes por los valiosos comentarios y críticas formulados sobre el borrador del presente trabajo

a los compañeros y personal del Laboratorio de Química Biológica por su colaboración y amistad.

LISTA DE SIMBOLOS Y SIGLAS

- $A_{\lambda}$  : absorbancia a la longitud de onda  $\lambda$  .
- ADP: adenosina difosfato.
- ATP: adenosina trifosfato.
- $^{\circ}$  C: grado centígrado.
- cm: centímetro.
- CM: cloranfenicol.
- cpm: cuentas por minuto.
- $\mu$ Ci: microcurie.
- DA: fenotipo DA: fenotipo caracterizado por terminación anticipada (respecto al silvestre) de la síntesis de DNA.
- dCMP: ácido deoxicitidílico.
- DD: fenotipo DD: fenotipo caracterizado por iniciación retardada (respecto al silvestre) de la síntesis de DNA.
- DNA: ácido deoxirribonucleico.
- DO: fenotipo DO: fenotipo defectivo en síntesis de DNA.
- $DO_{\lambda}$  : densidad óptica a la longitud de onda  $\lambda$  .
- dTTP: deoxitimidina trifosfato.
- dUMP: ácido deoxiuridílico.
- dUTP: deoxiuridina trifosfato.
- $E_{\lambda}$  : absorbancia específica (unidades de absorbancia por unidad de longitud y de concentración) a la longitud de onda  $\lambda$  .
- g: gramo.
- $\mu$ g: microgramo.
- GDP: guanosina difosfato.
- gp: producto del gen: entidad por la cual se expresa el gen.
- GTP: guanosina trifosfato.
- HMU: 5-Hidroximetiluracilo.
- l: litro.
- M: molar.
- mg: miligramo.
- m.i.: multiplicidad de infección.
- ml: mililitro.
- min: minuto.

mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

NAL: ácido nalidixico.

nm: nanometro.

Pi: fosfato.

P.M.: peso molecular.

% (p/v): gramos de soluto por cada 100 ml de solución.

RIF: rifampicina.

RNA: ácido ribonucleico.

rpm: revoluciones por minuto.

sus: fenotipo sus: fenotipo supresible.

TCA: ácido tricloroacético.

ts: fenotipo ts: fenotipo sensible a la temperatura.

## INDICE

Página

### INTRODUCCION

I. EL BACTERIOFAGO SPO 1 Y SU DESARROLLO EN <i>Bacillus subtilis</i> .	1
A. Efectos sobre la bacteria.	2
B. Síntesis de proteínas.	4
C. Síntesis de RNA.	5
D. Síntesis de DNA.	13
II. EL MUTANTE <i>ts-14-1</i> Y EL DESARROLLO DEL BACTERIOFAGO SPO 1.	17

### MATERIALES Y METODOS

I. BACTERIAS Y BACTERIOFAGOS.	18
II. MEDIOS DE CULTIVO.	19
III. SOLUCIONES.	19
IV. COMPUESTOS MARCADOS CON ISOTOPOS RADIOACTIVOS.	20
V. ANTIBIOTICOS.	20
VI. ENZIMAS.	20
VII. PREPARACIONES.	21
A. Bacteriofagos.	21
B. DNA.	22
C. RNA.	22
VIII. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.	24
A. Bacterias viables.	24
B. Título de un lisado, bacteriofagos libres y bacterias infectadas.	24
C. Bacteriofagos totales e intracelulares.	25
D. Bacteria indicadora.	25
E. Complementación en medio sólido.	25
F. Síntesis de DNA.	26
G. Síntesis de RNA.	26
H. Test de Hibridización.	27
I. Transiciones en las condiciones de cultivo.	27
1. Transiciones con dilución.	27
2. Transiciones sin dilución.	28

### RESULTADOS

I. COMPORTAMIENTO DEL MUTANTE <i>ts-14-1</i> EN CONDICIONES PERMISIVAS.	30
---	----

	<b>Página</b>
A. Crecimiento de ts-14-1 en B. subtilis 168 M a 37° C.	31
B. Síntesis de DNA en B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 37° C.	33
C. Nivel de transcripción viral en B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 37° C.	35
D. Análisis de los resultados	37
<b>II. ESTUDIO "IN VIVO" DEL MUTANTE ts-14-1 EN DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO.</b>	<b>39</b>
A. Transiciones desde condiciones permisivas a no permisivas.	39
B. Transiciones desde condiciones no permisivas a permisivas.	45
C. Análisis de los resultados.	47
D. Combinación de transiciones entre condiciones permisivas y no permisivas.	49
<b>III. INFLUENCIA DEL GEN 31 SOBRE LA REPLICACION Y LA TRANSCRIPCION.</b>	<b>56</b>
A. Influencia del gen 31 sobre la replicación.	57
B. Influencia del gen 31 sobre la replicación en ausencia de transcripción.	59
C. Influencia del gen 31 sobre la transcripción.	61
D. Influencia del gen 31 sobre la transcripción en ausencia de replicación.	67
E. Análisis de los resultados.	75
 <b><u>DISCUSION</u></b>	
I. FENOTIPO DE ts-14-1 a 37° C.	78
II. NATURALEZA Y TIEMPOS DE ACCION Y SINTESIS DE gp31.	81
III. EFECTOS DE gp31 SOBRE LA REPLICACION Y LA TRANSCRIPCION.	85
 <b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>91</b>
 <b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>93</b>



LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura		Página
1	Síntesis de RNA y DNA durante el desarrollo del bacteriofago SPO 1.	3
2	Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con SPO 1 silvestre o con ts-14-1 a 37° C.	32
3	Incorporación de <sup>3</sup> H-Adenina en DNA por B. subtilis 168 M infectado con SPO 1 silvestre o con ts-14-1 a 37° C.	34
4	Nivel de transcripción viral en B. subtilis 168 M infectado con SPO 1 silvestre o con ts-14-1.	36
5	Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con SPO 1 silvestre a 37° C y transferido a 44° C o a medio con cloranfenicol.	41
6	Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 37° C y transferido a 44° C o a medio con cloranfenicol.	42
7	Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con SPO 1 silvestre a 44° C y transferido a 37° C.	46
8	Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y transferido a 37° C.	48
9	Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 y sometido a transiciones entre condiciones permisivas y no permisivas.	51
10	Incorporación de <sup>3</sup> H-Adenina en DNA por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y sometido a transiciones térmicas.	58

Figura		Página
11	Incorporación de <sup>3</sup> H-Adenina en DNA y RNA por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y sometido a transiciones térmicas en presencia de Rifampicina.	60
12	Incorporación de <sup>3</sup> H-Adenina en RNA por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y sometido a transiciones térmicas.	62
13	Nivel de transcripción viral en B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y sometido a transiciones térmicas.	65
14	Nivel de transcripción viral en B. subtilis 168 M infectado con sus-F-30 o con sus-F-30/ts-14-1 a 44° C y transferido a 37° C a los 15 minutos.	69
15	Incorporación de <sup>3</sup> H-Adenina en DNA y RNA por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y sometido a transiciones térmicas en presencia de ácido nalidíxico.	72
16	Nivel de transcripción viral en B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y transferido a 37° C en presencia de ácido nalidíxico.	74
17	Posibles modos de acción de gp31 sobre la replicación y la transcripción.	76
Tabla		
1	Inhibición de la síntesis de DNA por ácido nalidíxico en B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 37° C.	71

I N T R O D U C C I O N

## I. EL BACTERIOFAGO SPO 1 Y SU DESARROLLO EN *Bacillus subtilis*.

El bacteriofago SPO 1 fue aislado por S. Okubo (Okubo & col., 1964). Es un bacteriofago grande, cuyo DNA, de doble cadena, tiene un peso molecular (P. M.) aproximado de  $10^8$  Daltons (Studier, 1965; Doty & col., 1968) y una composición de bases poco frecuente.

En efecto, su DNA carece de timina y en su lugar contiene 5-hidroximetiluracilo (HMU); en este sentido es similar a otros bacteriofagos de *B. subtilis*, tales como SP 6, SP 7, SP 8, SP 9, SP 13, SP 82, 5 C, 2 C, Ø 25 y Ø E (Aposhian, 1965). Esta composición especial de la molécula de DNA da lugar a una densidad de flotación en CsCl por encima de lo habitual,  $1.74 \text{ g/cm}^3$  (Okubo & col., 1964) y una menor estabilidad de la doble hélice a la temperatura. La temperatura de "melting" ( $T_m$ ) es  $75^\circ \text{C}$ , mientras que sería  $88^\circ \text{C}$  si contuviera timina, ya que el contenido de GC es 45 % (Okubo & col., 1964).

Se han aislado unos doscientos mutantes letales condicionales, de tipo supresible (Okubo & col., 1972) y sensibles a la temperatura (Añón, 1974; Glassberg & col., 1977 c). Estos mutantes han sido clasificados por complementación en 36 cistrones. Se ha confeccionado un mapa genético, mediante cruces de dos y tres puntos, en el que se ubicaron treinta y cuatro de esos cistrones; los mutantes de los dos cistrones restantes (35 y 36) presentan frecuencias de recombinación muy altas con cualquiera de los representantes de los otros genes, por lo que podrían ubicarse en uno o ambos extremos del mapa (Okubo & col., 1972).

Dado que el tamaño del genoma (alrededor de  $2 \times 10^5$  pares de bases), permite suponer un número de funciones superior a cien, es muy posible que muchos cistrones aún no hayan sido identificados.

Durante el desarrollo del bacteriofago, se pueden distinguir diversas etapas caracterizadas por la síntesis de los diferentes precursores de partículas virales, de moléculas con funciones regulatorias, de otras destinadas a reprimir la síntesis de componentes bacterianos,

el armado de los virus de la progenie y la lisis final.

Estas etapas han sido estudiadas con distinta intensidad, durante el ciclo lítico de SPO 1. Un esquema que muestra algunos de los principales conocimientos actuales, se presenta en la Figura 1, que se analiza en detalle más adelante.

En general, se ha utilizado la cepa 168 M de *B. subtilis*, infectada a 37° C, aún cuando SPO 1 infecta también a otras cepas y a diferentes temperaturas. Aquí nos referiremos, a menos que sea aclarado, a la infección de *B. subtilis* 168 M a 37° C por SPO 1.

A lo largo de esta introducción se realizarán ocasionales comparaciones entre SPO 1 y otros bacteriofagos, en particular T 4. Esas referencias a T 4 tienen el propósito de establecer diferencias o similitudes entre SPO 1 y un bacteriofago ampliamente conocido, que posee un genoma de tamaño comparable y con una composición de bases que también incluye una poco frecuente (5-hidroximetil citosina en reemplazo de timina).

#### A. Efectos sobre la bacteria.

El metabolismo bacteriano sufre cambios drásticos luego de la infección. La síntesis de DNA de *B. subtilis* se detiene al cabo de 6-8 minutos post-infección. Esta conclusión ha sido extraída de diferentes experiencias. Shub (1966) midió la incorporación de timina en material estable al álcali y precipitable con ácido; este precursor puede incorporarse a DNA bacteriano pero no al viral, pues éste no contiene timina y no hay una ruta metabólica directa que permita transformarla en HMU. Wilson (1969) aprovechó la diferencia en la densidad de flotación de ambos DNAs en CsCl para separarlos y así determinar la síntesis de cada uno de ellos después de la infección. Estos gradientes de densidad también indicaron que el genoma bacteriano no se degrada, aún a tiempos largos post-infección. Por otra parte, Gage (1969) llegó a conclusiones similares midiendo la síntesis de DNA total en bacterias infectadas con mutantes de SPO 1 defectivos en replicación (D0).

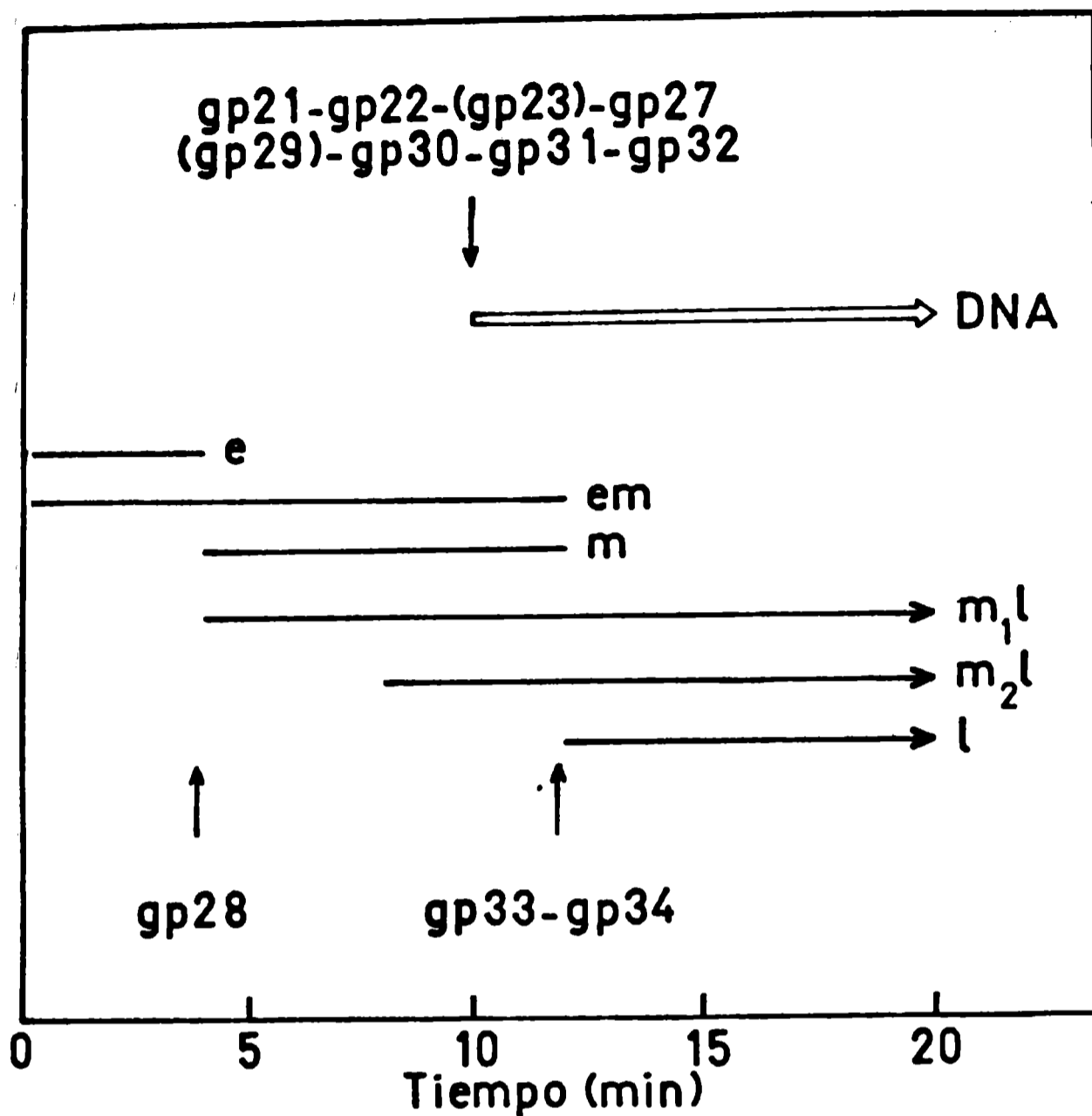


Figura 1. Síntesis de RNA y DNA durante el desarrollo del bacteriofago SPO 1.

Las barras horizontales representan la síntesis de las distintas clases de mRNAs virales, definidas por ensayos de hibridación-competición. Las clases han sido denominadas e, em, m, m<sub>1</sub>l, m<sub>2</sub>l y l. ↑ gpX indica el requerimiento del producto del gen X.

La escala de tiempo se inicia con la infección y corresponde al ciclo lítico de SPO 1 silvestre en *B. subtilis* 168 M a 37° C. Para la confección de este esquema se han tomado datos de Grau & col., 1970; Gage & Geiduschek, 1971 a; Fujita & col., 1971; Okubo & col., 1972; Añón & Grau, 1973; Fox, 1976; Fox & col., 1976 y Tjian & Pero, 1976.

gp28 no ha sido incluido dentro de los productos necesarios para la replicación debido a que no es éste su efecto primario.

La preservación del genoma bacteriano había sido sugerida por Okubo & col. (1964), quienes habían logrado la transferencia de marcadores por transformación, usando DNA de bacterias infectadas como donante. Posteriormente, Yehle & Ganesan (1972) obtuvieron los mismos resultados en experiencias similares.

Es probable que la detención de la replicación bacteriana sea consecuencia directa de la actividad del bacteriofago. Algunas funciones virales están dirigidas a hidrolizar los nucleótidos de timina o a evitar su síntesis. El conocimiento de estas funciones deriva de estudios realizados con otros bacteriofagos, SP 8, 5 C, Ø E, pero los mecanismos parecen ser comunes a todos los miembros del grupo que contiene HMU (Roscoe & Tucker, 1964; Marmur & col., 1963; Aposhian, 1965; Aposhian & Tremblay, 1966; Haslam & col., 1967; Roscoe, 1969 a y b).

#### B. Síntesis de proteínas.

La síntesis de numerosas proteínas de *B. subtilis* es reprimida poco después de la infección con SPO 1 (Shub, 1966). Sin embargo, otras siguen produciéndose; así, se obtiene incorporación de aminoácidos radioactivos a proteínas ribosomales durante el desarrollo del bacteriofago.

En cuanto a las proteínas virales, Shub (1966) elaboró un diagrama de aparición y desaparición de diferentes polipéptidos durante el desarrollo de SPO 1. Los estudios fueron realizados mediante marcación con precursores radioactivos y fraccionamiento electroforético en geles de poliacrilamida. Shub agrupó las proteínas virales en tres clases. Las pertenecientes a la clase uno se sintetizan en períodos tempranos del desarrollo y probablemente son productos de la traducción de mRNAs de las clases e y/o em (Ver más adelante). Entre estas proteínas seguramente debe encontrarse el producto del gen 28, proteína regulatoria a la cual nos referiremos luego.

Hacia los seis minutos post-infección se detectan los

polipéptidos de la clase dos, que continúan produciéndose hasta después de iniciada la síntesis del DNA viral. Esta segunda clase incluye dos enzimas necesarias para la replicación, la dCMP deaminasa (Wilson, 1969; Shub, 1975) y la dUMP hidroximetilasa (Haslam & col., 1967), la actividad DNA polimerasa (Yehle & Ganesan, 1973) y las proteínas regulatorias gp33 y gp34 (Fox, 1976).

La tercera clase de proteínas virales aparece en períodos más tardíos del desarrollo (post-replicación) y continúa hasta la lisis; representantes de esta clase probablemente sean las proteínas estructurales del bacteriofago (Fujita & col., 1971) y la lisozima (Okubo & col., 1972).

Estos cambios en la composición de los productos de la traducción son posiblemente la consecuencia de modificaciones en la calidad y proporción relativa de los mRNAs sintetizados a lo largo del ciclo lítico de SPO 1.

### C. Síntesis de RNA.

La transcripción en una bacteria infectada da origen a productos codificados por ambos genomas, viral y bacteriano. Los mecanismos de los que se vale el bacteriofago para modular la transcripción en su beneficio ha sido uno de los problemas bioquímicos más atrayentes de los últimos años, pues se lo ha considerado como un caso relativamente sencillo de regulación de la expresión genética. En este sentido y a pesar de haber sido menos estudiado que algunos bacteriofagos de E. coli, SPO 1 ha permitido establecer inequívocamente algunas de las formas por las que el genoma viral puede dirigir su propia expresión, modificando apropiadamente la dotación enzimática celular.

Los estudios de síntesis de RNA en B. subtilis infectado con SPO 1 fueron iniciados utilizando técnicas de hibridización de RNA a DNA con y sin competición por otros RNAs (Gage, 1969; Gage & Geiduschek, 1967; Gage & Geiduschek, 1971 a y b).



El resultado de esas investigaciones fue la formulación de un programa de transcripción, cuyos aspectos salientes son la presencia de, por lo menos, seis clases de mRNAs virales, cuya aparición y desaparición permite agruparlas en tempranas (e y em), intermedias (m, m<sub>1</sub> y m<sub>2</sub>) y tardía (l), en concordancia con lo observado respecto a síntesis de proteínas (Figura 1).

Dentro del primer minuto post-infección, comienza la sintesis de mRNAs virales, cuya proporción relativa (estimada como la fracción del RNA total que hibridiza a DNA de SPO 1) va creciendo hasta los 5-7 minutos, en que alcanza niveles del orden del 30-50 %, luego disminuye ligeramente para incrementarse nuevamente y mantener hasta la lisis un nivel del 30-50 %.

La transcripción del genoma bacteriano queda reducida a niveles muy bajos, aunque no se anula y puede recuperarse si existen bloqueos en el desarrollo viral.

Un panorama similar ha sido observado durante la infección de *B. subtilis* por el bacteriofago SP 82 (Spiegelman & Whiteley, 1974).

Los mRNAs virales tempranos de SPO 1 (e y em) son producidos aún cuando la síntesis de proteínas se encuentre inhibida por cloranfenicol (Gage & Geiduschek, 1967). A su vez, una preparación de RNA polimerasa obtenida de bacterias no infectadas, transcribe DNA de SPO 1, produciendo mRNAs tempranos (Grau y col., 1970), sugiriendo que no se necesitan modificaciones virales del aparato de transcripción celular para la síntesis de dichos RNAs.

Esta característica de la transcripción de los primeros mensajes codificados por el bacteriofago la presentan también otros virus bacterianos, como SP 82 (Spiegelman & Whiteley, 1974), T 4 (Salser & col., 1970) y T 7 (Siegel & Summer, 1970).

La síntesis de las clases intermedias de mRNAs codificados por SPO 1 es dependiente de la síntesis de proteínas. En particular depende de la traducción de un mRNA temprano que contiene el mensaje para el producto del gen 28 (gp28).

Mutantes en el gen 28 no transcriben mRNAs intermedios en condiciones no permisivas (Grau & col., 1970; Fujita & col., 1971; Añón & Grau, 1973). Estas observaciones sugirieron que gp28 podría ser el responsable de conferir a la RNA polimerasa bacteriana la especificidad necesaria para reconocer los promotores correspondientes a los mensajes intermedios (Fujita & col., 1971).

Estas especulaciones han sido plenamente comprobadas por una serie de evidencias que han probado que gp28 es una proteína de P. M. 28000, que se asocia a la RNA polimerasa bacteriana, copurifica con ella y le proporciona la capacidad de transcribir los mensajes intermedios (Añón & Grau, 1973; Duffy & Geiduschek, 1973 a y b; Fox & Pero, 1974; Duffy & Geiduschek, 1975; Pero & col., 1975 a; Fox & col., 1976).

Más aún, la enzima bacteriana puede ser modificada "in vitro" por gp28 y así sintetizar mRNAs intermedios (Duffy & col., 1975).

Además, la transcripción "in vitro" con enzima modificada por gp28 produce mRNAs intermedios funcionales; en efecto, en un sistema de síntesis de proteínas acelular dependiente de DNA de SPO 1 y RNA polimerasa de bacterias infectadas, se obtiene producción de dCMP deaminasa (Swanton & col., 1975).

Por otra parte, gp28 y/o otro producto codificado por SPO 1 (probablemente gp33) afectan la unión de la RNA polimerasa al DNA, aumentando la afinidad por DNA de SPO 1 y disminuyéndola respecto a DNAs heterólogos. La enzima puede formar así complejos de iniciación específicos, propiedad que no exhibe la RNA polimerasa de bacterias no infectadas (Duffy & Geiduschek, 1976).

En el caso del bacteriofago T 4, la transcripción de la segunda clase de mRNAs (temprano-retardada), es dependiente de la síntesis de proteínas (Salser & col., 1970). Se propusieron dos modelos para interpretar este requerimiento. El primero consideraba que uno de los mRNAs de la primera clase dirigiría la síntesis de

una proteína antagonista del factor de terminación bacteriano, rho (Salser & col., 1970), permitiéndolo así que la transcripción continúe hacia los genes temprano-retardados. El segundo proponía que el producto viral modificaría la especificidad de la RNA polimerasa bacteriana, para reconocer los promotores temprano-retardados (Travers, 1969 y 1970).

Recientemente se ha demostrado que realmente existe una proteína codificada por T 4, que gobierna la iniciación de los mRNAs pertenecientes a la segunda clase (Linder & Sköld, 1977), pero no se conoce aún qué gen codifica para esta proteína regulatoria. El mecanismo de acción de este producto correspondería, según Linder & Sköld (1977), al segundo de los propuestos, pero no se descarta la existencia de una actividad anti-rho. Es posible que operen ambos mecanismos, de modo complementario.

La iniciación de la transcripción de los mRNAs intermedios de SPO 1 ocurre al mismo tiempo que la represión de la clase temprana e. Una causa de esta coincidencia podría ser la nueva especificidad de la RNA polimerasa. A este respecto, la enzima que contiene gp28 no transcribe mRNAs e, "in vitro" (Duffy & Geiduschek, 1975; Pero & col., 1975 a y b).

Otra posibilidad sería la existencia de un represor de la transcripción de la clase e. Se ha aislado y purificado un represor de la transcripción a partir de bacterias infectadas con SPO 1 (Wilson & Geiduschek, 1969; Johnson & Geiduschek, 1972). Se trata de una proteína básica, de P. M. 11500 Daltons. Su síntesis se inicia después de la infección y se acumula en gran cantidad en la bacteria infectada. Esta proteína, llamada TF 1, tiene alta afinidad por DNA de SPO 1 y de otros bacteriofagos de *B. subtilis* que contienen HMU (Wilson & Geiduschek, 1969). TF 1 inhibe "in vitro" la síntesis de proteínas dependiente de DNA de SPO 1, pero no la dependiente de DNA de T 4 (Wilhelm & col., 1972) ni la traducción de mRNAs de SPO 1 (Shub & Johnson, 1975).

Sin embargo, no se tiene una evidencia clara de qué función cumple TF 1 "in vivo", pues no parece ser un inhibidor específico de la síntesis de mRNAs de clase e, sino que su unión al DNA limita la transcripción de diversos genes (Shub & Johnson, 1975).

Por otra parte, no se conoce qué gen codifica para TF 1 ni se han estudiado mutantes de SPO 1 que no transcribiendo genes intermedios continúen transcribiendo los genes tempranos. Esta última situación se observa si se inhibe la síntesis de proteínas en la bacteria infectada (Gage & Geiduschek, 1967). En estas condiciones, no se inicia la transcripción de genes intermedios y la de los tempranos continúa hasta por lo menos 28 minutos post-infección. Por otra parte, dado que la carencia de gp28 impide la síntesis de mRNAs intermedios sin afectar la represión de la transcripción temprana, (Fujita & col., 1971) debe existir otro producto viral que ponga término a la síntesis de los mRNAs de clase e.

La otra clase temprana, em, deja de transcribirse cuando gp28 está inactivo pero no en presencia de cloranfenicol. Sin embargo, su terminación no es simultánea con la de la clase e, sino posterior, hacia los 12 minutos post-infección. A este tiempo también se reprime la transcripción de la clase intermedia m, por un mecanismo no conocido, que podría ser común al de la clase em, aunque ésta última es reprimida aún cuando no se transcriba la clase m.

De manera que sabemos muy poco sobre la represión de la transcripción en este sistema y no hay pruebas de que TF 1 cumpla alguna/s de estas funciones "in vivo".

La síntesis de por lo menos dos de las clases de mRNAs intermedios (m y m<sub>1</sub>) sólo requeriría la modificación introducida por gp28 en el aparato de transcripción bacteriano (posiblemente también se transcriban así algunas especies m<sub>2</sub>).

La transcripción de la sexta clase de mRNAs, 1, post-replicativa, de la mayor parte de las especies m<sub>2</sub> y, en general,

la transcripción tardía, está condicionada por la actividad de los genes 33 y 34 (Fujita & col., 1971) y la replicación del DNA (Gage & Geiduschek, 1971 b).

La función de los productos de los genes 33 y 34 ha sido dilucidada y consiste en una modificación de la especificidad de la RNA polimerasa.

Estos productos son dos proteínas, de P. M. 24000 (gp34) y 13500 (gp33) (Fox, 1976), que copurifican con la RNA polimerasa (Fox & Pero, 1974) y le confieren capacidad de transcribir "in vitro" genes tardíos (Pero & col., 1975 b). Así mismo, la adición de gp33 y gp34, purificados, al núcleo de RNA polimerasa bacteriana, (polipéptidos  $\alpha_2 \beta \beta'$ ), permite la síntesis de mensajeros tardíos (Tjian & Pero, 1976).

Si bien es claro que gp33 y gp34 son los responsables de la transcripción viral tardía en *B. subtilis* infectado con SPO 1, algunos aspectos de esta segunda modificación de la maquinaria de transcripción no están aclarados.

Así Tjian & Pero (1976) obtienen transcripción de genes tardíos con gp33, gp34 y núcleo de RNA polimerasa, pero dependiente de una proteína celular de P. M. 21500 que denominan delta. En ausencia de delta, la transcripción tardía no sería selectiva en cuanto a la cadena de DNA utilizada como modelo. Este efecto ha sido observado reiteradamente por estos autores y no sólo en el caso de la transcripción de los genes tardíos sino también en el caso de los intermedios (Pero & col., 1975 a y b).

Sin embargo, delta no parece ejercer influencia sobre la enzima bacteriana (no modificada por SPO 1).

Otros autores han obtenido repetidamente transcripción de genes intermedios dependiente de gp28 sin necesidad de delta (Duffy & Geiduschek, 1975; Duffy y col., 1975).

De este modo, el papel de delta en la transcripción viral no es claro, así como el que podría jugar en la bacteria no infectada.

Por otra parte, la transcripción tardía dependiente de gp33 y gp34 (y delta; Tjian & Pero, 1976) es efectuada por el núcleo de RNA polimerasa. Este resultado implicaría que gp28 no permanece unido al núcleo cuando se incorporan gp33 y gp34. Sin embargo, la enzima copurifica con gp28, gp33 y gp34, cuando se la extrae a tiempos relativamente largos post-infección (Fox & Pero, 1974) y gp28 debe permanecer activo durante todo el ciclo lítico, para permitir la producción de bacteriofagos (Añón, 1974). Es posible que la unión de gp28 a la enzima no sea requisito para la posterior acción de gp33 y gp34, en cuyo caso debe suponerse que, tardiamente, existen dos poblaciones de enzima, una unida a gp28 y otra a gp33 y gp34.

No se conoce la razón por la cual gp33 y gp34 deben actuar conjuntamente (Tjian & Pero, 1976). Estos productos son sintetizados al mismo tiempo, desde los 5-6 minutos post-infección (Fox, 1976). A su vez, sus-F-14 (gen 33) no sólo es defectivo en la producción de gp33 sino también en gp34, de modo que podría existir un fenómeno de polaridad o bien la expresión del gen 34 podría estar controlada por gp33.

La síntesis de mRNAs tardíos del bacteriofago T 4 también depende de la actividad de dos genes, 33 y 55 (Bolle & col., 1968; Pulitzer, 1970; Pulitzer & Geiduschek, 1970). Estos genes codifican para dos proteínas que copurifican con la RNA polimerasa y cuyos P. M. son 12000 (gp33; Horvitz, 1973; Stevens, 1974) y 22000 (gp55; Horvitz, 1973; Stevens, 1974; Ratner, 1974).

Además de los productos de los genes 33 y 34, la transcripción tardía en *B. subtilis* infectado con SPO 1 es dependiente de la replicación del genoma viral. Esta dependencia es, posiblemente, el aspecto menos conocido del programa de síntesis de RNA en este sistema.

Los mutantes defectivos en replicación (DO) han sido divididos en dos grupos, según nivel de transcripción tardía (Añón,

1974). Un grupo estaría integrado por representantes de los cis-trones 29 al 32, que presentan un nivel de transcripción tardía muy bajo y no transcribirían mRNAs  $m_{21}$ . El otro grupo, genes 21 y 22, estaría caracterizado por la presencia de algunos transcriptos de clase  $m_{21}$  y un nivel de transcripción tardía mayor que el del otro grupo, aunque mucho más bajo que el correspondiente al bacteriofago silvestre (Añón, 1974).

Además, la proporción de RNA viral transcripto tardíamente por un mutante DO, en condiciones no permisivas (ts-14-1, gen 31), es proporcional a la multiplicidad de infección, dentro de los muy bajos niveles alcanzados. Esto ha sido interpretado como una indicación de que la cantidad de modelo disponible para la transcripción (DNA intracelular) puede ser uno de los factores involucrados en la transcripción tardía (Añón, 1974).

Por otra parte, los mutantes sus-F-14 (gen 33) y sus-F-4 (gen 34) presentan un nivel de transcripción tardía bajo, a pesar de sintetizar abundante cantidad de DNA (Fujita & col., 1971); sin embargo, el proceso de maduración de DNA replicado está bloqueado en sus-F-4 (Levner, 1972).

En el caso del bacteriofago T 4, la transcripción tardía aparece estrictamente acoplada a la replicación del DNA viral (Riva & col., 1970 a). Pero el acople puede evitarse por inactivación de las funciones de los genes 46 (exonucleasa) y 30 (DNA ligasa) (Riva & col., 1970 b).

Estos autores han propuesto que el DNA recientemente replicado constituye un buen modelo para la transcripción tardía, pero que el proceso de maduración (afectado por los productos de los genes 30 y 46) lo transforma rápidamente en un modelo ineficaz, posiblemente porque la maduración elimina cortes en las cadenas de DNA, (Cascino & col., 1970) restringiendo el número de sitios accesibles para la RNA polimerasa. De manera que la síntesis continúa de DNA sería la garantía de mantenimiento de un alto nivel de transcripción tardía.

Este tipo de estudio no ha sido realizado con SPO 1. Una de las dificultades existentes es el desconocimiento de las funciones codificadas por los cistrones cuyos mutantes son defectivos en replicación.

Sin embargo, experiencias comunicadas recientemente por Glassberg & col., (1977 a, b y c) y los resultados que aquí se presentan, parecen ayudar a la comprensión de las interrelaciones replicación-transcripción tardía, en este sistema.

#### D. Síntesis de DNA.

Habíamos expresado que la replicación bacteriana resulta completamente inhibida hacia los 6-8 minutos post-infección (Shub, 1966; Wilson, 1969; Gage, 1969), aunque el DNA existente no parece sufrir degradación (Okubo & col., 1964; Wilson, 1969; Yehle & Ganesan, 1972).

La síntesis de DNA viral comienza a los 10 minutos después de la infección de *B. subtilis* 168 M por SPO 1 silvestre. Experimentos de superinfección han demostrado que el tiempo que media entre la inyección del genoma infectante y el comienzo de su replicación es utilizado en su mayor parte en la preparación (síntesis y ensamble) de la maquinaria requerida para la replicación (Cregg & Stewart, 1977). En cambio, sería muy escaso el tiempo invertido en introducir modificaciones en el DNA infectante.

La síntesis de DNA de SPO 1 se supone depende de una actividad de DNA polimerasa dependiente de DNA, codificada por el virus, actividad que ha sido hallada en bacterias infectadas con SPO 1. Sin embargo, no se ha establecido qué gen dirigiría la síntesis de esta enzima.

Una vez iniciada, la replicación prosigue durante todo el ciclo lítico, aunque no produce inmediatamente DNA maduro, sino que se originan sucesivamente dos formas intermediarias que finalmente producen el genoma que será incorporado a las partículas de la progenie (Levner & Cozzarelli, 1972).



El primer intermediario, VF, es un complejo de DNA viral con proteínas y RNA que sedimenta con velocidad 4 a 6 veces superior a la del DNA maduro. El segundo intermediario, F, con una velocidad de sedimentación 3 veces mayor a la del DNA maduro, parece ser un DNA multigenómico, de alto peso molecular. Ambos intermediarios parecen contener numerosas zonas de simple cadena.

La forma VF se acumula desde la iniciación de la replicación hasta unos 10 minutos más tarde, en que comienza a transformarse rápidamente en la forma F, la cual es convertida en DNA maduro (Levner & Cozzarelli, 1972).

El proceso de maduración requiere síntesis de proteínas; en su ausencia, se acumula la forma VF. Otro tanto ocurre durante la infección con el mutante sus-F-4 (gen 34), indicando que una o más funciones tardías (cuya expresión depende de gp34; ver anteriormente) está involucradas en la conversión de VF a F (Levner, 1972).

Cuando la infección se realiza con el mutante sus-F-7 (gen 6), defectivo en la formación de cabezas de bacteriofagos, la maduración del DNA transcurre normalmente (Levner, 1972).

De manera que el empaquetamiento del genoma en la cabeza del bacteriofago no sería condición necesaria para el desarrollo normal del proceso de maduración del DNA replicado.

De los 36 cistrones conocidos en SPO 1, varios presentan alteración en la replicación (Okubo & col., 1972). Nueve cistrones, 21 a 23 y 27 a 32, son esenciales para la síntesis de DNA. De éstos, el 28 seguramente produce un fenotipo DO debido a su función en la expresión de los mensajes intermedios (ver anteriormente). La información disponible actualmente permite sospechar que los genes 23 y 29 codifican para las enzimas deoxinucleótido quinasa y dUMP hidroximetilasa, respectivamente (Glassberg & col., 1977c); estas enzimas son necesarias para la síntesis de HMU, uno de los sustratos de la síntesis de DNA de SPO 1.

Algunos mutantes en otros cistrones parecen afectar la replicación, aún cuando no anulan la incorporación de precursor radioactivo. Se trata de mutantes que inician la replicación más tarde que el silvestre (fenotipo DD; sus-F-47, gen 2) o la terminan anticipadamente (fenotipo DA; sus-F-37 y sus-F-42, gen 3; sus-O-38, gen 4; sus-F-6, gen 11; sus-F-31 y sus-HA-10, gen 12; sus-O-75, gen 13; sus-O-71 y sus-F-11, gen 14). Sin embargo, la asignación de estos fenotipos DD y DA no es del todo convincente, pues, en algunos casos, los resultados de Okubo y col. (1972) no concuerdan con los de Fujita (1971). De cualquier manera, es interesante observar el aparente agrupamiento de los genes que producen un determinado fenotipo.

Dentro de los cistrones cuyos productos son esenciales para la replicación (Figura 1), el 21 y el 32 parecen codificar para productos que actúan en la iniciación pero no en la elongación de la cadena de DNA (Glassberg & col., 1977 a).

A su vez, la terminación de la replicación es afectada por el producto del gen 32 (Glassberg & col., 1977 a).

Los productos de los genes 22, 30 y 31 participarían en la elongación de las cadenas nacientes de DNA, aún cuando no se excluye la posibilidad de que también estén implicados en la iniciación (Glassberg & col., 1977 a).

En cuanto a la dirección de la replicación y la posición de los orígenes del proceso en el genoma viral, Glassberg & col. (1977 b) han obtenido bastante información utilizando técnicas de rescate de marcadores y seguimiento del genoma infectante, en bacterias infectadas con diversos mutantes DO.

Así han propuesto que SPO 1 tiene al menos dos orígenes de replicación. Uno de ellos se ubica en el cistrón 32, o muy cerca de él; desde allí la replicación avanza unidireccionalmente hacia la izquierda, hasta el cistrón 3, aproximadamente. El otro origen estaría ubicado en el extremo izquierdo o en el extremo

derecho del mapa de SPO 1, aunque su localización no puede establecerse con claridad debido al escaso conocimiento genético de la región de los genes 35 y 36 (Glassberg & col., 1977 b). Los autores han postulado que, desde este segundo origen, la replicación avanza bidireccionalmente.

## II. EL MUTANTE ts-14-1 Y EL DESARROLLO DEL BACTERIFAGO SPO 1.

El mutante ts-14-1 fue aislado y caracterizado según se describe en Materiales y Métodos.

En condiciones no permisivas (44° C) ts-14-1 es defectivo en síntesis de DNA; la incorporación de <sup>3</sup>H-Adenina en material estable al álcali y precipitable por ácido es tan baja como la obtenida con otros mutantes DO (Añón, 1974).

ts-14-1 presenta también una marcada disminución de la transcripción de su genoma a partir de los 10 minutos post-infección a 44° C, lo cual implica síntesis deficitaria de mRNAs de las clases m<sub>1</sub>l, m<sub>2</sub>l y l (Añón, 1974).

La transcripción de los mensajes correspondientes a las clases e, em y m no parece estar alterada en ts-14-1 (Añón, 1974).

El nivel de transcripción tardía es proporcional a la cantidad de modelo (DNA) disponible. Así, dicho nivel crece desde 0.8 a 4 % cuando la multiplicidad de infección pasa de 4 a 16 bacteriofagos/bacteria. Pero aún a las mayores multiplicidades de infección probadas, la proporción de RNA que hibridiza a DNA de SPO 1 es unas 10 veces menor que la obtenida con el tipo silvestre (Añón, 1974).

El fenotipo de ts-14-1 hizo pensar en la posibilidad de utilizarlo para estudiar las relaciones entre la transcripción intermedia y tardía y la replicación del genoma viral.

A lo largo del trabajo que sigue se ha tratado de establecer el tipo de función correspondiente al cistrón mutado, los tiempos de síntesis y acción de esa función, la relación entre la actividad de la misma y el fenotipo del mutante y su ubicación dentro del desarrollo del bacteriofago SPO 1.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

## I. BACTERIAS Y BACTERIOFAGOS.

Se utilizó *Bacillus subtilis* 168 M (Burkholder & Giles, 1947). Esta cepa requiere indol o triptofano y su tiempo de duplicación, en medio CHT líquido, es 30-32 minutos, a 37 o 44° C.

Los bacteriofagos usados fueron SPO 1 silvestre (Okubo & col., 1964) y los mutantes ts-14-1 y sus-F-30/ts-14-1.

ts-14-1 fue aislado, mediante mutagénesis química con N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, por los Dres. O. Grau e I. Lahti en el laboratorio del Dr. E. P. Geiduschek (Chicago, U.S.A., 1970) y caracterizado como sensible a la temperatura. La infección de *B. subtilis* 168 M con ts-14-1 a 37° C conduce a la lisis bacteriana, con un rendimiento de aproximadamente 30 bacteriofagos/bacteria infectada, mientras que a 44° C no se produce lisis y la progenie (luego de la lisis enzimática externa de las bacterias) es del orden de 0.2 bacteriofagos/bacteria infectada (Añón, 1974). Por su parte, el tipo silvestre de SPO 1 infecta y lisa a *B. subtilis* 168 M a 37 y 44° C, produciendo aproximadamente 50 y 20 bacteriofagos/bacteria infectada, respectivamente. Por otra parte, ts-14-1 es un mutante simple, perteneciente al cistrón 31 del mapa genético de SPO 1 (Añón, 1974).

El mutante doble sus-F-30/ts-14-1 fue obtenido durante el presente trabajo por cruce de ts-14-1 con sus-F-30, mutante simple, supresible, perteneciente al cistrón 22 (Okubo & col., 1972).

La cruce se realizó infectando simultáneamente *B. subtilis* HA 101 B (cepa supresora; Okubo & Yanagida, 1968) con sus-F-30 y ts-14-1, a 37° C, en medio líquido L (Gage & Fujita, 1969). Se trata de una infección en condiciones permisivas para ambos mutantes. El lisado obtenido se tituló sobre *B. subtilis* HA 101 B a 37° C, en medio sólido L. Las placas de lisis obtenidas fueron repicadas sobre *B. subtilis* HA 101 B a 37° C, *B. subtilis* HA 101 B a 44° C y *B. subtilis* 168 M a 37° C. Se seleccionaron aquéllas que dieron lisis

sobre la cepa HA 101 B a 37° C y no lo hicieron en las otras dos condiciones. Luego de la resuspensión en SS-Mg, se las tituló en las tres condiciones antes mencionadas. Se eligieron las resuspensiones cuyo título sobre B. subtilis HA 101 B a 37° C fue 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> veces mayor que sobre la misma bacteria a 44° C y sobre la cepa 168 M a 37° C. De esta manera se eliminan las placas correspondientes a SPO 1 silvestre (produce lisis en cualquier condición), sus-F-30 (lisa a la cepa HA 101 B a 44° C, ya que no es sensible a la temperatura) y ts-14-1 (lisa a la cepa 168 M a 37° C). Las placas seleccionadas corresponderán a un bacteriofago que debe ser sensible a la temperatura y supresible.

Luego se verificó la presencia de las mutaciones deseadas (genes 22 y 31), por complementación en medio sólido. Se seleccionaron las resuspensiones que no complementaron con sus-F-30 ni con ts-14-1 y sí lo hicieron con representantes de otros cistrones (sus-F-60, cistrón 26; sus-F-26, cistrón 30 y sus-ts-0-36, cistrón 28; Okubo & col., 1972). Una de estas resuspensiones fue usada en los experimentos cuyos resultados se consignan más adelante.

## II. MEDIOS DE CULTIVO.

CHT (por litro): 0.056 g de CaCl<sub>2</sub>; 0.076 g de MgCl<sub>2</sub>; 100 ml de SS (x10); 0.050 g de L-triptofano; 1.25 g de hidrolizado de caseína y 5 g de glucosa.

Agar-CHT (por litro): CHT más 15 g de Agar Difco o equivalentes.

Agar Blando salino (por litro): 8 g de NaCl y 7.5 g de Agar Difco.

## III. SOLUCIONES.

× Solución mínima de sales (SS) (por litro): 2 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 14 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1 g de citrato de sodio.

SS-Mg: SS más MgCl<sub>2</sub> 5 x 10<sup>-3</sup> M

Tris-Mg: Tris-Cl  $10^{-2}$  M pH 7.5 más Mg Cl<sub>2</sub>  $5 \times 10^{-3}$ .

RSB: KCl  $10^{-2}$  M; MgCl<sub>2</sub>  $5 \times 10^{-3}$  M y Tris-Cl  $10^{-2}$  M pH 7.5.

SSC: NaCl 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M.

Tris-KCl: Tris-Cl  $10^{-2}$  M pH 7.5 y KCl 0.5 M.

Se utilizaron reactivos pro-análisis o de grado bacteriológico en la preparación de los distintos medios y soluciones.

#### IV. COMPUESTOS MARCADOS CON ISOTOPOS RADIOACTIVOS.

<sup>3</sup>H-Adenina, <sup>3</sup>H-Uracilo y <sup>3</sup>H-Uridina: Obtenidos de New England Nuclear.

#### V. ANTIBIOTICOS.

Cloranfenicol (CM): Obtenido del Laboratorio Parke-Davis.

Las soluciones se prepararon, en CHT, en el momento de usarlas.

Rifampicina (RIF): Obtenida del Laboratorio Lepetit.

Las soluciones se prepararon en etanol y se conservaron a  $-20^{\circ}$  C. La concentración final de etanol en el medio de cultivo fue 0.35 % (v/v)

Acido Nalidíxico (NAL): Obtenido del Laboratorio Winthrop.

Las soluciones se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) y se conservaron a  $-20^{\circ}$  C. La máxima concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue 3 % (v/v). Esta concentración de DMSO se agregó también al cultivo control (sin NAL).

#### VI. ENZIMAS.

Lisozima: Obtenida de Worthington Biochemical Corporation.

Enzima libre de sales.

Ribonucleasa: Obtenida de Sigma (Tipo IX-A; de páncreas bovino)



Enzima libre de proteasa.

Antes de ser utilizada se inactivó la DNAsa contaminante por calentamiento a 90° C durante 5 minutos, en Tris-Cl  $10^{-2}$  M pH 7.5.

## VII. PREPARACIONES.

### A. Bacteriofagos.

SPO 1 silvestre y el mutante ts-14-1 se obtuvieron infectando *B. subtilis* 168 M, en fase logarítmica de crecimiento ( $DO_{500nm}$  0.4 - 0.5;  $0.8 - 1 \times 10^8$  bacterias/ml), en CHT, a 37° C y multiplicidad de infección (m.i.) 0.03 bacteriofagos/bacteria. Una vez ocurrida la lisis ( $DO_{500nm} = 0.05$  aproximadamente), se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos (centrífuga Sorvall, rotor GSA). Los títulos obtenidos oscilaron entre 0.5 y  $1 \times 10^{10}$  bacteriofagos/ml.

Para todos aquellos experimentos que requerían muy buena infectividad, se utilizaron lisados purificados hasta esta etapa.

Cuando se necesitaban lisados más purificados y concentrados, la preparación anterior se centrifugó a 12000 rpm durante 90 minutos (centrífuga Sorvall, rotor GSA). El sedimento se dejó durante 10 a 15 horas en contacto con Tris-Mg y luego se resuspendió en dicho buffer, empleando aproximadamente 5 ml de Tris-Mg por cada litro de lisado original. Esta resuspensión se centrifugó durante 10 minutos a 8000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS-34), para eliminar agregados. El sobrenadante se purificó finalmente por centrifugación en gradiente discontinuo de CsCl (formado por capas de CsCl de 70, 60, 50, 40, 30 y 20 % de saturación en Tris-Cl 0.1M pH 7.5), durante 25 minutos a 27000 rpm (ultracentrífuga Spinco L 2, rotor # 50). La fracción opalescente que contenía los bacteriofagos se dializó contra Tris-Mg. La suspensión así obtenida contenía de 1 a  $2 \times 10^{12}$  partículas capaces de formar placas de lisis por mililitro y entre 10 y 25 Unidades de absorbancia a 260 nm por mililitro.

En todos los casos los lisados y los bacteriofagos purificados se mantuvieron a 4° C.

#### B. DNA (de SPO 1).

Se obtuvo a partir de SPO 1 silvestre, purificado en gradiente de CsCl, de acuerdo al método de Mandell y Hershey (1960). A una suspensión de bacteriofagos (10-12 Unidades de absorbancia a 260 nm por mililitro) se le agregó un volumen igual de fenol bides-tilado, previamente equilibrado a temperatura ambiente con Tris (base) 0.1 M y NaCl 0.1 M. Se practicó la extracción a temperatura ambiente y las fases se separaron por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos (centrífuga Sorvall, rotor SS-34). La fase acuosa se reextrajo en las mismas condiciones, hasta desaparición de película blanca en la interfase fenol/agua. En general fueron suficientes cuatro extracciones. La fase acuosa final se dializó contra Tris-Cl 10<sup>-2</sup> M pH 7.5 y NaCl 1 M y luego contra Tris-Cl 10<sup>-2</sup> M pH 7.5.

La preparación se conservó a 4° C.

La concentración de DNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm ( $E_{260 \text{ nm}} = 2.0 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ), utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-Modelo G-2400. Las soluciones de DNA se consideraron suficientemente libres de proteínas y fenol cuando cumplan la condición  $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} = 2$ .

Los rendimientos oscilaron entre 0.2 y 0.4 miligramos de DNA por litro de cultivo original.

#### C. RNA.

Para preparar <sup>3</sup>H-RNA marcado por pulsos se infectaron bacterias en fase logarítmica de crecimiento ( $DO_{500 \text{ nm}} = 0.5$ ) con el bacteriofago y a la temperatura que en cada caso se indican (Ver las leyendas de las Figuras 4, 13, 14 y 16) y a m.i. = 10 bacteriofagos/bacteria.

A distintos tiempos después de la infección se agregó al cultivo <sup>3</sup>H-Uracilo o <sup>3</sup>H-Uridina, hasta alcanzar las concentraciones

y actividades que se indican en cada caso (los valores consignados corresponden a  $\mu\text{Ci}$  y  $\mu\text{g}$  por mililitro de cultivo, valores finales en el experimento). Al cabo de 2 minutos se detuvo la incorporación, enfriando el cultivo con la mitad de su volumen de SS-Mg congelado (en presencia de  $\text{NaN}_3$   $10^{-2}$  M). Una vez fría, la suspensión de células infectadas se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS-34). El sedimento se resuspendió en RSB (más  $\text{NaN}_3$   $10^{-2}$  M), empleando un volumen de 0.5 a 1 ml por cada 10 ml de cultivo original. Se agregó lisozima hasta 0.3 mg/ml y la suspensión se congeló rápidamente con etanol a  $-80^\circ\text{C}$  y se calentó a  $37^\circ\text{C}$  hasta descongelamiento. Se repitió el congelamiento y calentamiento, continuando este último, luego de descongelada la suspensión, hasta que comenzó la lisis celular (habitualmente después que había transcurrido 1-2 minutos, desde el descongelamiento, a  $37^\circ\text{C}$ ). En ese momento se agregó dodecilsulfato de sodio hasta 1% (p/v) y acetato de sodio pH 5.5 hasta 0.1 M e inmediatamente después fenol bidestilado (previamente equilibrado con agua).

Se practicó la extracción fenólica a  $70^\circ\text{C}$ , se enfrió rápidamente en baño de hielo y se centrifugó durante 10 minutos a 8000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS-34). La capa acuosa se reextrajo, en las mismas condiciones, hasta desaparición de película blanca en la interfase fenol/agua. En general fueron suficientes cuatro extracciones. La fase acuosa final se dializó contra Tris-Cl  $10^{-2}$  M pH 7.5 y NaCl 1 M y luego contra Tris-Cl  $10^{-2}$  M pH 7.5.

Los  $^3\text{H}$ -RNAs se conservaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm ( $E_{260\text{ nm}} = 2.3 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ), utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-Modelo C-2400. Las soluciones de RNA se consideraron suficientemente libres de proteínas y fenol cuando cumplían la condición  $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}} = 2$ .

Los rendimientos oscilaron entre 0.01 y 0.03 mg por mililitro de cultivo y las incorporaciones entre 20000 y 50000 cpm por mililitro de cultivo, dependiendo del bacteriofago utilizado en la

infección, de la temperatura del cultivo, de la presencia de inhibidores y de la actividad específica del precursor utilizado.

#### VIII. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

##### A. Bacterias viables.

Para determinar el número de bacterias viables se extendieron 0.05 a 0.1 ml de una dilución apropiada de bacterias en SS-Mg sobre una placa de Petri con el medio sólido que corresponda. Las colonias pueden contarse al cabo de 12 horas a 37° C.

##### B. Título de un lisado, bacteriofagos libres y bacterias infectadas.

El título de un lisado (número de partículas capaces de formar placa de lisis por mililitro de lisado) se determinó de la siguiente manera: se preparó una dilución apropiada de lisado (en SS-Mg); se mezcló 0.1 ml de esta dilución con 0.2 ml de bacteria indicadora y 2.5-3 ml de agar blando salino (fundido y mantenido a 45-50° C). Esta mezcla se extendió sobre una placa de Petri con medio sólido apropiado. Al cabo de 12-15 horas de incubación a 37 o 44° C, se pueden contar las placas de lisis.

La suma de bacteriofagos libres y bacterias infectadas por mililitro de cultivo infectado se determinó a partir de una dilución apropiada del cultivo infectado, siguiendo la técnica descrita anteriormente.

El número de bacteriofagos libres (no adsorbidos a bacterias) en un cultivo infectado se determinó del siguiente modo: se centrifugó una alícuota del cultivo infectado durante 10 minutos a 10000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS-34). El sobrenadante de la centrifugación contenía los bacteriofagos libres (las bacterias infectadas sedimentan). Se preparó una dilución apropiada del sobrenadante y se la tituló, como hemos descrito. El número de bacterias infectadas se obtuvo restando el de bacteriofagos libres del total de bacteriofagos libres y bacterias infectadas.

### C. Bacteriofagos totales e intracelulares.

A una alícuota de cultivo infectado se le agregó lisozima hasta 0.3 mg/ml y NaCN hasta  $5 \times 10^{-3}$  M. Luego de incubar 15 minutos a  $37^{\circ}$  C se diluyó convenientemente y se sembró de la manera indicada en B. El número de placas de lisis obtenidas correspondió a los bacteriofagos totales. El número de bacteriofagos intracelulares se obtuvo restando el número de bacteriofagos libres del de bacteriofagos totales.

### D. Bacteria indicadora.

Un cultivo saturado (12-15 horas) se diluyó unas 50 veces en medio fresco y se mantuvo en baño termostatzado, con agitación, hasta  $DO_{500 \text{ nm}} = 1.5$  aproximadamente. De esta manera se logró un cultivo con alrededor de  $3 \times 10^8$  bacterias/ml, en fase logarítmica de crecimiento, de modo que 0.1-0.2 ml del mismo eran suficientes para formar una capa continua sobre una placa de Petri con medio apropiado, en 12 horas a  $37$  o  $44^{\circ}$  C.

### E. Complementación en medio sólido.

Las complementaciones se realizaron agregando sucesivamente y en forma superpuesta, una gota de cada uno de los bacteriofagos que se deseaban complementar, sobre una placa de Petri con medio sólido y una placa superior de ágar blando salino con  $3-4 \times 10^7$  bacterias apropiadas.

Las gotas contenían un número de bacteriofagos tal que era el máximo posible sin agregar revertantes.

Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones no permisivas para el par de mutantes a complementar. Para el caso de complementación entre mutantes supresibles y sensibles a la temperatura se utilizó B. subtilis 168 M (no supresor) y la temperatura de incubación fue  $44^{\circ}$  C. Además se practicaron los controles positivos (lisis en condiciones permisivas) y negativos (no lisis en condiciones no permisivas), para cada uno de los bacteriofagos a complementar.

La complementación se consideró positiva cuando se observó placa de lisis donde se agregaron superpuestos los dos bacteriofagos y no se la observó donde se agregaron cada uno de ellos por separado. Se la consideró negativa cuando no se observó placa de lisis en ninguno de los tres sitios.

#### F. Síntesis de DNA.

La síntesis de DNA se midió a través de la incorporación de  $^3\text{H}$ -Adenina en material estable al álcali y precipitable por ácido tricloroacético (TCA).

Se infectaron bacterias en fase logarítmica de crecimiento ( $\text{DO}_{500 \text{ nm}} = 0.5$ ) con el bacteriofago y a la temperatura que en cada caso se indican (Ver las leyendas de las Figuras 3, 10, 11 y 15 y de la Tabla 1) y a m.i. =  $10^7$  bacteriofagos/bacteria. A los tiempos indicados en cada caso se agregó al cultivo infectado  $^3\text{H}$ -Adenina hasta las concentraciones y actividades que se consignan.

A distintos tiempos se tomaron muestras de 0.5 ml que se agregaron a 1 ml de KOH 1M y fueron incubadas durante 3 horas a  $45^\circ\text{C}$ . Transcurrido dicho tiempo, las muestras se precipitaron, en frío, con TCA 5% (p/v; concentración final). Los precipitados fueron recogidos sobre filtros de nitrocelulosa, lavados tres veces con TCA 5% (alrededor de 10 ml por vez) y luego con 0.5 ml de etanol/agua (70/30). Los filtros se secaron y contaron con tolueno-Omnifluor (New England Nuclear; 4 g/l), en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb.

#### G. Síntesis de RNA.

La síntesis de RNA total se midió a través de la incorporación de  $^3\text{H}$ -Adenina en material álcali lábil y precipitable por TCA.

La infección y agregado de precursor se realizaron como para el caso de la síntesis de DNA (Ver las leyendas de las Figuras 11, 12 y 15).

A distintos tiempos se tomaron muestras de 0.5 ml, que fueron agregadas a 1 ml de KOH 1 M. Inmediatamente después, se agregó TCA hasta 5 % a una parte de la mezcla y el precipitado se recogió,

lavó y contó como para el caso de síntesis de DNA. El resto de la mezcla se hidrolizó, para determinar incorporación a DNA.

La incorporación a RNA resultó de restar de la total (pre-hidrólisis alcalina) la incorporación en DNA (post-hidrólisis alcalina), multiplicadas ambas por los factores apropiados para su expresión en cpm/0.5 ml de cultivo.

## II. Ensayo de hibridización.

Se realizó según el método de Nygaard y Hall (1964). Se incubó  $^3\text{H}$ -RNA con exceso de DNA de SPO 1 (20-40  $\mu\text{g/ml}$ , concentración final), en SSC x 2, durante tres horas a  $70^\circ\text{C}$ , en un volumen final de 0.200 ml. Inmediatamente antes de ser agregado, el DNA fue desnaturalizado por calentamiento a  $100^\circ\text{C}$ , durante 10 minutos, en Tris-Cl  $10^{-2}\text{ M}$  pH 7.5.

Finalizada la incubación se agregó RNAsa hasta 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , incubando 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ .

Los híbridos se recogieron sobre filtros de nitrocelulosa, lavando tres veces con Tris-KCl (aproximadamente 10 ml por vez) y una vez con 0.5 ml de etanol/agua (70/30). Los filtros se secaron y contaron como se describió anteriormente.

## I. Transiciones en las condiciones de cultivo.

### 1. Transiciones con dilución.

Las transiciones térmicas y entre medios con y sin cloranfenicol fueron realizadas por dilución cuando el objeto del experimento era medir producción de bacteriofagos (Figuras 5, 6, 7, 8 y 9).

Se infectó *B. subtilis* 168 M en fase logarítmica de crecimiento ( $\text{DO}_{500\text{ nm}} = 0.4$ ), a  $37$  o  $44^\circ\text{C}$ , con SPO 1 silvestre o ts-14-1, según el caso y a multiplicidad de infección baja (menor que 0.5 bacteriofagos/bacteria). En estas condiciones, el número de bacteriofagos libres, que constituye el blanco del experimento, fue suficientemente bajo como para permitir determinaciones significativas. A los 2 minutos, los cultivos se diluyeron 50-100 veces sin cambiar

las condiciones, para evitar las reinfecciones que podrían producirse cuando el experimento se prolongó más allá del tiempo requerido para la lisis de las bacterias infectadas. Entre los 4 y 5 minutos post-infección se determinaron los números de bacteriofagos libres y de bacterias infectadas.

A distintos tiempos se realizaron los cambios de temperatura, diluyendo 50-100 veces una alícuota de cultivo a 37° C en medio a 44° C, o viceversa. Para las transiciones entre medios con y sin cloranfenicol el factor de dilución fue 100 y las concentraciones finales de cloranfenicol fueron 0.1 y 0.001 mg/ml, respectivamente.

La adición de 0.1 mg/ml de cloranfenicol a un cultivo de *B. subtilis* 168 M, a 37° C, anula completa e inmediatamente la incorporación de <sup>14</sup>C-Leucina a proteínas (Romanowsky & col., 1974, resultados no publicados).

Luego de 60 minutos de realizada la transición se determinó la producción de bacteriofagos, lisando una alícuota del cultivo con lisozima y NaCN (concentraciones finales 0.3 mg/ml y  $5 \times 10^{-3}$  M, respectivamente) y sembrando una dilución apropiada del lisado sobre *B. subtilis* 168 M, como se ha descrito. A esta producción se le restó en todos los casos el número de bacteriofagos libres.

El diseño del experimento combinado de la Figura 9 tiene algunas diferencias con lo que aquí se ha descrito (Ver la leyenda de la Figura 9).

## 2. Transiciones sin dilución

Las transiciones se realizaron sin dilución cuando se deseaba medir la incorporación, acumulativa o por pulsos, de precursores radioactivos a ácidos nucleicos. Además, en estos casos debieron emplearse altas multiplicidades de infección para que el mayor número de bacterias resultasen infectadas (Figuras 9 a 16).

Se infectó *B. subtilis* 168 M en fase logarítmica de crecimiento ( $DO_{500 \text{ nm}} = 0.5$ ) con ts-14-1, sus-F-30 o sus-F-30/ts-14-1, a



44° C y m.i. = 10 bacteriofagos/bacteria.

La transición desde 44 a 37° C se realizó a los 15 minutos post-infección, pasando el cultivo por un refrigerante helicoidal, cuya camisa contenía agua a 35° C y recibéndolo en un burbujeador equilibrado a 37° C. El refrigerante había sido lavado justo antes de la transición con 25 ml de SS-Mg a temperatura ambiente. En estas condiciones, el cultivo pasó de 44 a 37° C en 30 segundos aproximadamente. Para efectuar la transición desde 37 a 44° C se procedió en forma análoga, pasando el cultivo a través de un refrigerante helicoidal por cuya camisa circulaba agua a 56-57° C y que había sido lavado inmediatamente antes de la transferencia con 25 ml de SS-Mg a temperatura ambiente. El cultivo se recibió en un burbujeador equilibrado a 44° C. En estas condiciones, la temperatura de incubación pasó de 37 a 44° C en unos 30 segundos, sin que el cultivo sufriera sobrecalentamiento.

Un cultivo de *B. subtilis* 168 M, no infectado, sometido a un descenso y posterior ascenso de temperatura, en las condiciones indicadas aquí, continuó creciendo sin que se modificara su tiempo de duplicación.

RESULTADOS

## I. COMPORTAMIENTO DEL MUTANTE ts-14-1 EN CONDICIONES PERMISIVAS.

El desarrollo de SPO 1 silvestre en *B. subtilis* 168 M a 37° C presenta una serie de etapas, definidas por un conjunto de eventos típicos del ciclo lítico del bacteriofago. Estos eventos consisten en la transcripción de las diferentes clases de mRNAs, su traducción, la replicación del material genético, el armado de las partículas virales y la lisis de la bacteria. Existe un ordenamiento temporal de tales hechos y se pueden determinar experimentalmente los tiempos a los que se producen algunos de ellos.

Así, la síntesis de DNA comienza alrededor de 10 minutos después de la infección y no existen diferencias de importancia cuando se utilizan las cepas de *B. subtilis* HA 101 A y HA 101 B y cuando la temperatura de incubación es 44° C (Gage & Fujita, 1969; Wilson & Gage, 1971; Añón, 1974).

Otro tiempo característico es el necesario para la aparición, dentro de la bacteria infectada, del equivalente a una partícula viral infectante. Este tiempo es de aproximadamente 25 minutos en las cepas 168 M y HA 101 A, tanto a 37° C como a 44° C. En cambio, en la cepa HA 101 B se requieren aproximadamente 50 minutos para la aparición del equivalente de un bacteriofago por bacteria infectada (Añón, 1974).

Debe tenerse en cuenta que estas determinaciones temporales son aproximadas, por cuanto la infección de una población numerosa de bacterias no es simultánea y el dato obtenido representa el promedio para toda la población. Este hecho introduce un error del orden de 1 a 2 minutos. Por otra parte, la determinación del número de bacteriofagos por bacteria infectada requiere la determinación del número de bacterias infectadas y del número de bacteriofagos internos, que involucran varias diluciones y el recuento de placas de lisis. Estas operaciones tienen un error relativo de alrededor de 5 % para cada medida de volumen y de  $N^{-1/2}$  para la determinación de un número N de placas de lisis.

Por estas razones, los tiempos de aparición de una partícula viral infectante por bacteria infectada provienen generalmente de varios experimentos y deben considerarse sólo como aproximados.

La determinación del comienzo de la síntesis de DNA tiene el error debido a la no simultaneidad de la infección. En cambio, la medida de <sup>3</sup>H-Adenina incorporada a material álcali estable ácido precipitable (método habitual para medir síntesis de DNA), tiene un error total pequeño, del orden de 5 %.

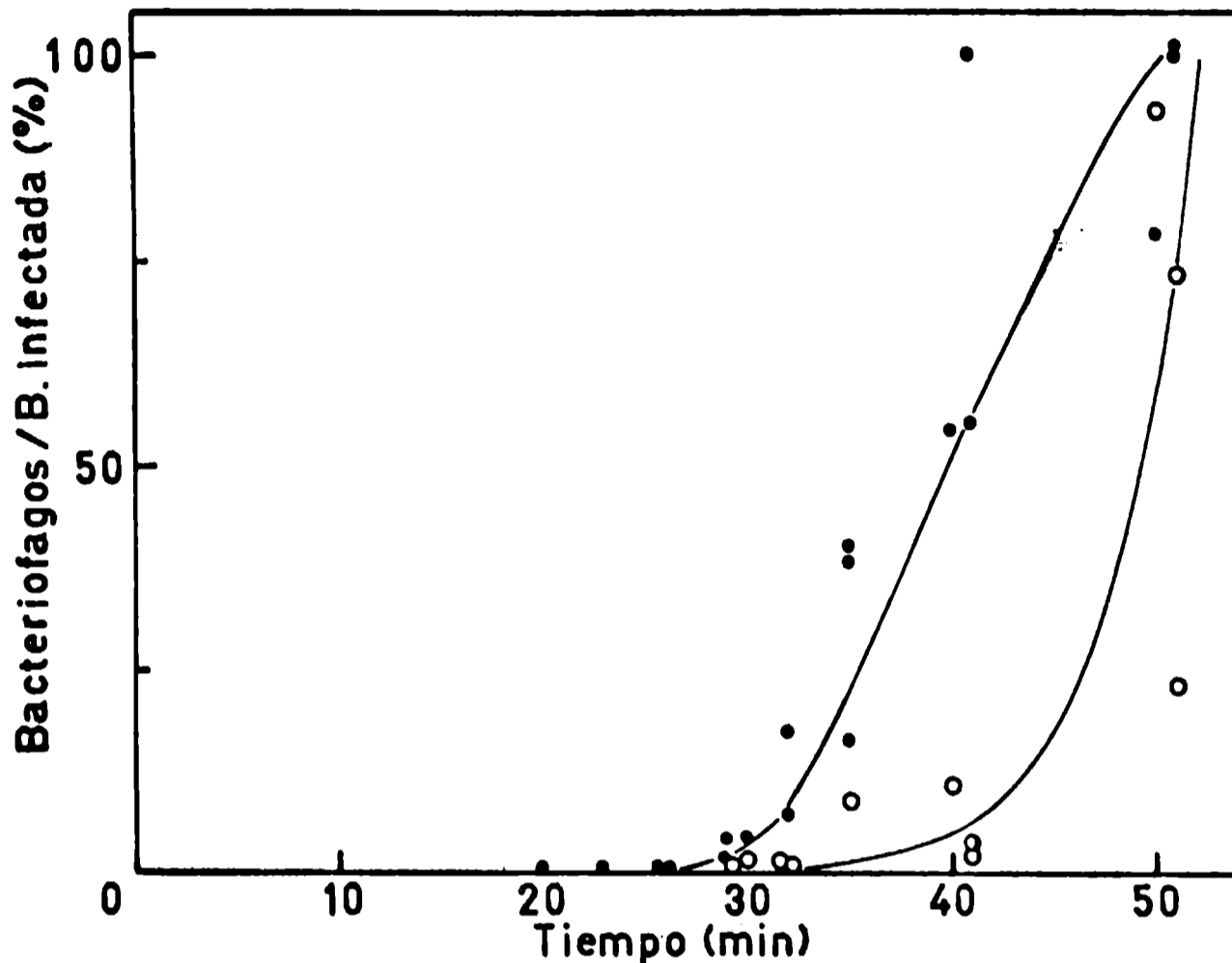
Otra característica del ciclo lítico la constituye la curva de nivel de transcripción viral a lo largo de la infección. Es decir, la proporción del RNA total, sintetizado en un momento dado por la bacteria infectada, que hibridiza a DNA del bacteriófago. Esta curva resulta de determinaciones cuyos errores son similares a los de la síntesis de DNA, relativamente bajos en comparación con las determinaciones de bacteriofagos producidos por bacteria infectada.

Aquí se han medido estos tres parámetros para el mutante ts-14-1, en condiciones permisivas (37°C), con el objeto de probar si su ciclo de vida es temporalmente normal (comparado con el del tipo silvestre). Como se verá, ts-14-1 muestra un retraso en su desarrollo en condiciones permisivas. El conocimiento de la magnitud de ese retraso y su ubicación en el ciclo lítico resultan imprescindibles para el análisis y discusión de los resultados de experimentos posteriores.

#### A. Crecimiento de ts-14-1 en B. subtilis 168 M a 37°C

Se determinó el número de bacteriofagos totales, a distintos tiempos después de la infección de Bacillus subtilis 168 M con ts-14-1 a 37°C. Los resultados se muestran en la Figura 2, en la que se han incluido también los obtenidos en un experimento del mismo tipo realizado con SPO 1 silvestre.

Puede apreciarse que, mientras el tipo silvestre alcanza el equivalente de un bacteriofago por bacteria infectada alrededor



**Figura 2. Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con SPO 1 silvestre o con ts-14-1 a 37° C.**

Los bacteriofagos totales se determinaron, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, a distintos tiempos después de la infección de B. subtilis 168 M con SPO 1 silvestre (●) o con ts-14-1 (○).

Los resultados se expresan como porcentaje del rendimiento obtenido 60 minutos después de la infección. Esos rendimientos fueron 50, 82 y 36 bacteriofagos/bacteria infectada, en tres experimentos con SPO 1 silvestre y 9, 60 y 24 bacteriofagos/bacteria infectada en tres experimentos con ts-14-1. Han sido restados los blancos (bacteriofagos libres a los 5 minutos post-infección), cuyos valores máximos fueron 0.7 y 0.4 % para SPO 1 silvestre y ts-14-1 respectivamente.

de los 28-29 minutos después de la infección, ts-14-1 lo hace aproximadamente a los 38 minutos después de la infección. Es decir, ts-14-1 muestra un retraso de unos 9-10 minutos respecto al silvestre para alcanzar el equivalente de un bacteriofago/bacteria infectada; luego de ese punto, no parece haber un retraso adicional en la producción de bacteriofagos. Esta diferencia es significativa, por ser sensiblemente mayor que la atribuible al error que acompaña a estas medidas. Además, la lisis celular (observada visualmente) presenta un retraso similar.

Quiere decir, entonces, que la mutación presente en ts-14-1 afecta a éste de un modo tal que, aún en condiciones permisivas, su desarrollo es más lento que el del tipo silvestre.

#### B. Síntesis de DNA en B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 37° C.

La síntesis de DNA en B. subtilis 168 M infectado con el mutante ts-14-1 a 37° C se midió por incorporación de <sup>3</sup>H-Adenina en material estable al álcali y precipitable por ácido tricloroacético. En la Figura 3 se muestran los resultados, junto a los obtenidos en un experimento análogo con el tipo silvestre de SPO 1.

Como puede apreciarse, en el tipo silvestre la síntesis de DNA se inicia aproximadamente 10 minutos después de la infección, en coincidencia con lo descrito por otros (Gage & Fujita, 1969; Wilson & Gage, 1971; Añón, 1974). En cambio, para el caso de ts-14-1 la replicación comienza lentamente y adquiere la pendiente del tipo silvestre recién hacia los 20 minutos después de la infección; de ahí en más, las curvas son aproximadamente paralelas y los valores finales son similares para el silvestre y el mutante.

Por lo tanto, se observa un retraso de unos 10 minutos en la iniciación de la replicación, que es del mismo orden del observado en el tiempo de aparición de un bacteriofago/bacteria infectada. Una vez iniciada, la síntesis de DNA ocurre aproximadamente a la misma velocidad que en el silvestre.

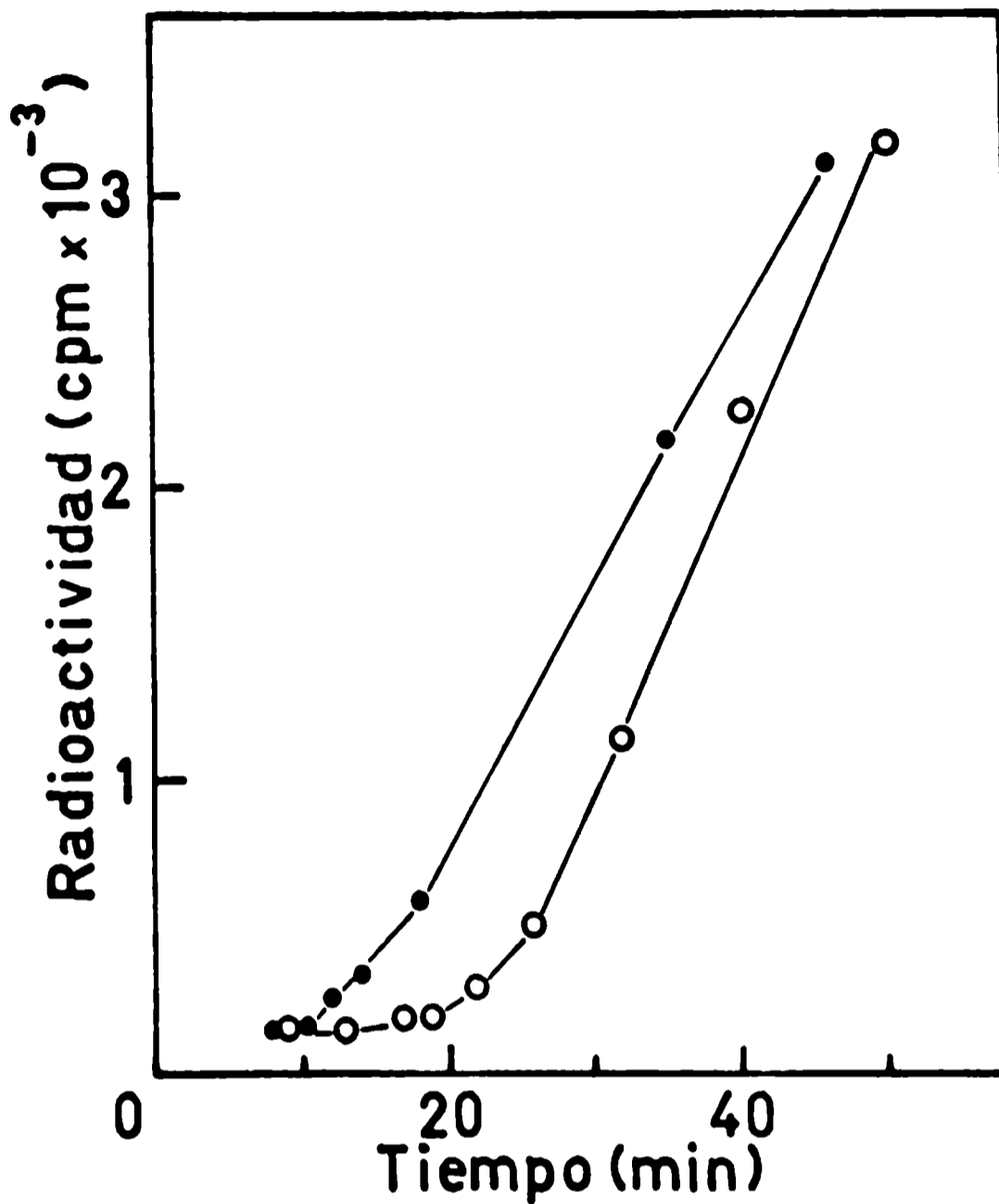


Figura 3. Incorporación de <sup>3</sup>H-Adenina en DNA por *B. subtilis* 168 M infectado con SPO 1 silvestre o con ts-14-1 a 37° C.

A los 6 minutos después de la infección de *B. subtilis* 168 M con SPO 1 silvestre (●) o con ts-14-1 (○), a 37° C, se agregó al cultivo <sup>3</sup>H-Adenina (2.7 μCi/ml y 17 μg/ml). A distintos tiempos se tomaron muestras de 0.5 ml que fueron procesadas como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de bacterias no infectadas fue 0.2, en ambos casos.

C. Nivel de transcripción viral en B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 37° C.

El nivel de transcripción viral se determinó por hibridación a DNA de SPO 1 de <sup>3</sup>H-RNAs obtenidos marcando RNA total con <sup>3</sup>H-Uridina durante pulsos de 2 minutos, a distintos tiempos después de la infección. En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos para B. subtilis infectado con ts-14-1 a 37° C. Se incluyen, también, los resultados obtenidos con el tipo silvestre, a 37° C, por Gage y Geiduschek (1971 a) y con ts-14-1 y SPO 1 silvestre, a 44° C, por Añón (1974). Se han incluido estas curvas, tomadas de la bibliografía, debido a que no fueron realizadas en forma completa durante este trabajo. Sin embargo, varios de sus puntos han sido repetidos como control, obteniéndose resultados concordantes.

La figura pone en evidencia el muy bajo nivel de transcripción exhibido por ts-14-1 a 44° C después de los 10 minutos post-infección, lo cual implica defectos importantes en la biosíntesis de RNAs de las clases m<sub>1</sub>l, m<sub>2</sub>l y l.

En el caso de SPO 1 silvestre a 37° C, la transcripción viral se incrementa rápidamente desde el segundo al séptimo minuto post-infección; luego decae, presentando un valle entre el octavo y el decimocuarto minuto; recupera a los 18-20 minutos el nivel de 6-7 minutos, manteniéndose aproximadamente constante hasta los 28 minutos. El nivel alcanzado en la zona del valle es alrededor de la mitad del correspondiente al pico y al tardío.

Para el caso de bacterias infectadas con ts-14-1, el nivel se incrementa rápidamente en los primeros minutos post-infección, alcanzando un máximo entre los 6 y 8 minutos. Luego decae, desde el noveno minuto y vuelve a incrementarse después de los 21 minutos, llegando recién entre los 28 y 30 minutos a niveles comparables a los observados entre los 5 y 8 minutos. Además, el nivel de transcripción en la zona del valle representa un tercio del alcanzado en el pico (6-8 minutos).



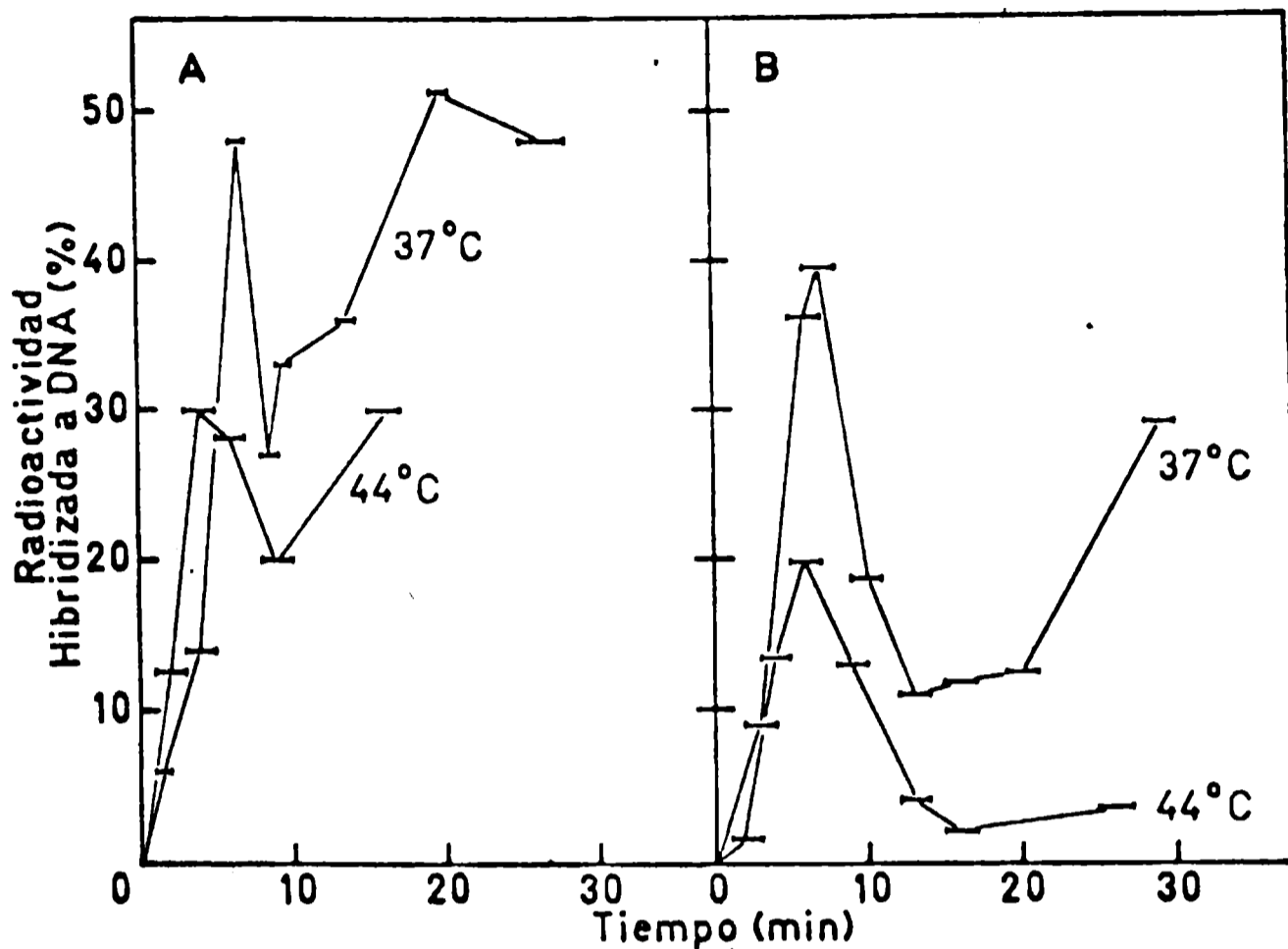


Figura 4. Nivel de transcripción viral en B. subtilis 168 M infectado con SPO 1 silvestre o con ts-14-1.

A diferentes tiempos después de la infección de B. subtilis 168 M con ts-14-1, a 37° C (parte B), se marcó RNA con <sup>3</sup>H-Uridina (20 µCi/ml y 0.36 µg/ml), durante pulsos de dos minutos. El porcentaje de bacterias no infectadas fue 0.5.

Los RNAs fueron aislados e hibridizados a DNA de SPO 1 de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

Los resultados de la parte A, correspondientes a SPO 1 silvestre, han sido tomados de Gage & Geiduschek, 1971 a (37° C) y de Añón, 1974 (44° C) y los de la parte B (ts-14-1 a 44° C) de Añón, 1974.

<sup>3</sup> H-RNA (ts-14-1; 37° C) Período de marcación (min)	Blanco en ausencia de DNA (cpm)	Radioactividad total agregada (cpm)
2-4	62	2939
5-7	27	674
6-8	34	487
9-11	32	714
12-14	27	320
15-17	41	763
19-21	74	483
28-30	82	868

La comparación de ambas curvas \* indica que ts-14-1 tiene un estiramiento temporal de la zona del valle, que toma de 6 a 10 minutos en el silvestre (como máximo) y que en el mutante se extiende no menos de 12 minutos (desde los 9 a los 21 minutos post-infección, como mínimo). Además, hasta los 7 minutos las curvas son muy similares, sugiriendo que no existe un retraso en etapas tempranas de la transcripción viral. En cambio, mientras el silvestre recupera, luego del valle, su nivel de transcripción máximo entre los 18 y 20 minutos post-infección, ts-14-1 lo hace recién entre los 28 y 30 minutos.

En otras palabras, ts-14-1 presenta un efecto de retardo de unos 10 minutos respecto al silvestre; ese retardo parece estar localizado entre los 8 y los 30 minutos post-infección, es decir en la zona del valle. Estos 20-22 minutos que ts-14-1 necesita para transitar el valle son sólo 10-12 minutos para el silvestre.

#### D. Análisis de los resultados.

El análisis en conjunto de los resultados de producción de bacteriofagos, síntesis de DNA y transcripción viral, indica que el desarrollo de ts-14-1 a 37° C está retrasado unos 10 minutos, respecto a SPO 1 silvestre. Este retraso parece establecerse luego de los 8 minutos post-infección, según lo sugieren las curvas de nivel de transcripción. De ahí en más, todos los parámetros medidos muestran un retraso, respecto al silvestre, aproximadamente constante. Si se considera que la zona del valle en la curva de nivel de transcripción, se extiende, en el silvestre, desde un poco antes que comience la replicación, hasta por lo menos 4 minutos después y que la aparición de un bacteriofago/bacteria infectada ocurre (también en el silvestre) unos 18-20 minutos después de iniciada la replicación, podemos ver que el retraso (unos 10 minutos) con que ts-14-1

---

\* La comparación es válida puesto que las multiplicidades de infección utilizadas en ambos casos son muy similares.

efectúa la síntesis de DNA con una cinética similar a la del silvestre, es suficiente para explicar los demás retrasos observados. Efectivamente, ts-14-1 alcanza el equivalente de un bacteriofago/bacteria infectada luego de unos 18 minutos de iniciada la replicación y el valle en la curva de transcripción viral, que comienza al mismo tiempo que en el silvestre, se extiende hasta un poco más allá del tiempo en que la replicación funciona con una velocidad similar a la del silvestre.

De modo que, aparentemente, el estiramiento temporal en el ciclo de vida de ts-14-1 está comprendido entre los 8 y los 20-22 minutos post-infección y una vez que la síntesis de DNA está restaurada, todos los eventos se desarrollan a velocidad semejante a la del silvestre, sin retardos adicionales ni recuperación del tiempo perdido.

Esta interpretación es especulativa, puesto que el único parámetro medido antes, durante y después de la presunta "etapa lenta" en el ciclo lítico del mutante, es el nivel de transcripción viral. Otras alternativas se discutirán posteriormente.

Sin embargo, el retraso existe y es del orden de 10 minutos con respecto al tipo silvestre.

## II. ESTUDIO "IN VIVO" DEL MUTANTE ts-14-1 EN DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO.

Los mutantes de bacteriofagos sensibles a la temperatura son muy útiles para el estudio "in vivo" de la mutación que presentan, del tipo de función que corresponde al cistrón mutado y del lapso de tiempo en el cual esa función se necesita para el desarrollo del bacteriofago (Pulitzer, 1970; Pulitzer & Geiduschek, 1970).

Esta posibilidad de estudio "in vivo" deriva de la facilidad que existe con los mutantes sensibles a la temperatura para cambiar rápidamente las condiciones de desarrollo desde la permisiva a la no permisiva y viceversa. Estos cambios bruscos son impracticables con mutantes supresibles (y de huésped en general).

Las transiciones rápidas en la temperatura de trabajo pueden combinarse con el agregado o la eliminación (o dilución) de antibióticos del medio de cultivo, con lo que aumentan las posibilidades de estudio con este tipo de mutantes.

La potencialidad de los experimentos de transiciones térmicas y de antibióticos, en cultivos de bacterias infectadas con mutantes de bacteriofagos sensibles a la temperatura, fue usada por Pulitzer para el estudio de la función del gen 55 del bacteriofago T 4 (Pulitzer, 1970; Pulitzer & Geiduschek, 1970) y por Añón para la del gen 28 de SPO 1 (Añón, 1974).

Se detallarán a continuación una serie de experimentos diseñados con el objeto de conocer: a) la naturaleza de la mutación presente en ts-14-1; b) el tipo de función del gen 31; c) el tiempo en el que la función del gen 31 se requiere para el desarrollo del bacteriofago SPO 1.

### A. Transiciones desde condiciones permisivas a no permisivas.

Los experimentos que siguen consisten en el brusco cambio en la temperatura de incubación de *B. subtilis* 168 M infectado con el mutante ts-14-1 desde 37° C (temperatura permisiva) a 44° C

(temperatura no permisiva), acompañado de la determinación del número de bacteriofagos presentes dentro de la bacteria al tiempo de la transición térmica, y de los producidos luego de 60 minutos de la misma. De los resultados obtenidos se puede inferir el tiempo mínimo que la función del gen 31 necesita para que su expresión se traduzca en la producción de progenie.

La maduración de precursores virales puede estimarse midiendo la producción de bacteriofagos luego de la transición desde condiciones permisivas a un medio en el que la síntesis de proteínas está inhibida.

Se realizaron en forma conjunta los experimentos de transiciones térmicas y de antibiótico y en paralelo para SPO 1 silvestre y el mutante ts-14-1.

Para ello se infectó *B. subtilis* 168 M a 37° C y a distintos tiempos se cambió rápidamente la temperatura a 44° C o se pasó a un medio con cloranfenicol. Se midieron los bacteriofagos internos al tiempo de las transiciones y los producidos 60 minutos después de ellas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5 para el tipo silvestre y en la Figura 6 para el mutante ts-14-1.

SPO 1 silvestre es parcialmente sensible a la transición desde 37 a 44° C hasta aproximadamente los 25 minutos después de la infección (Figura 5). Los resultados de 13 transiciones realizadas hasta ese tiempo arrojan un rendimiento promedio de 26% respecto al rendimiento a 37° C (error típico de la media = 4). A pesar de la gran variación exhibida por estos experimentos, el menor de los rendimientos obtenidos en las 13 transiciones mencionadas (6%) fue 20 veces superior al blanco correspondiente (0.3%).

Cuando las transiciones se realizaron entre 25 y 35 minutos después de la infección, los rendimientos se incrementaron, persistiendo la gran variación entre distintos experimentos. Luego de los 35 minutos, la transferencia desde 37 a 44° C no afectó la

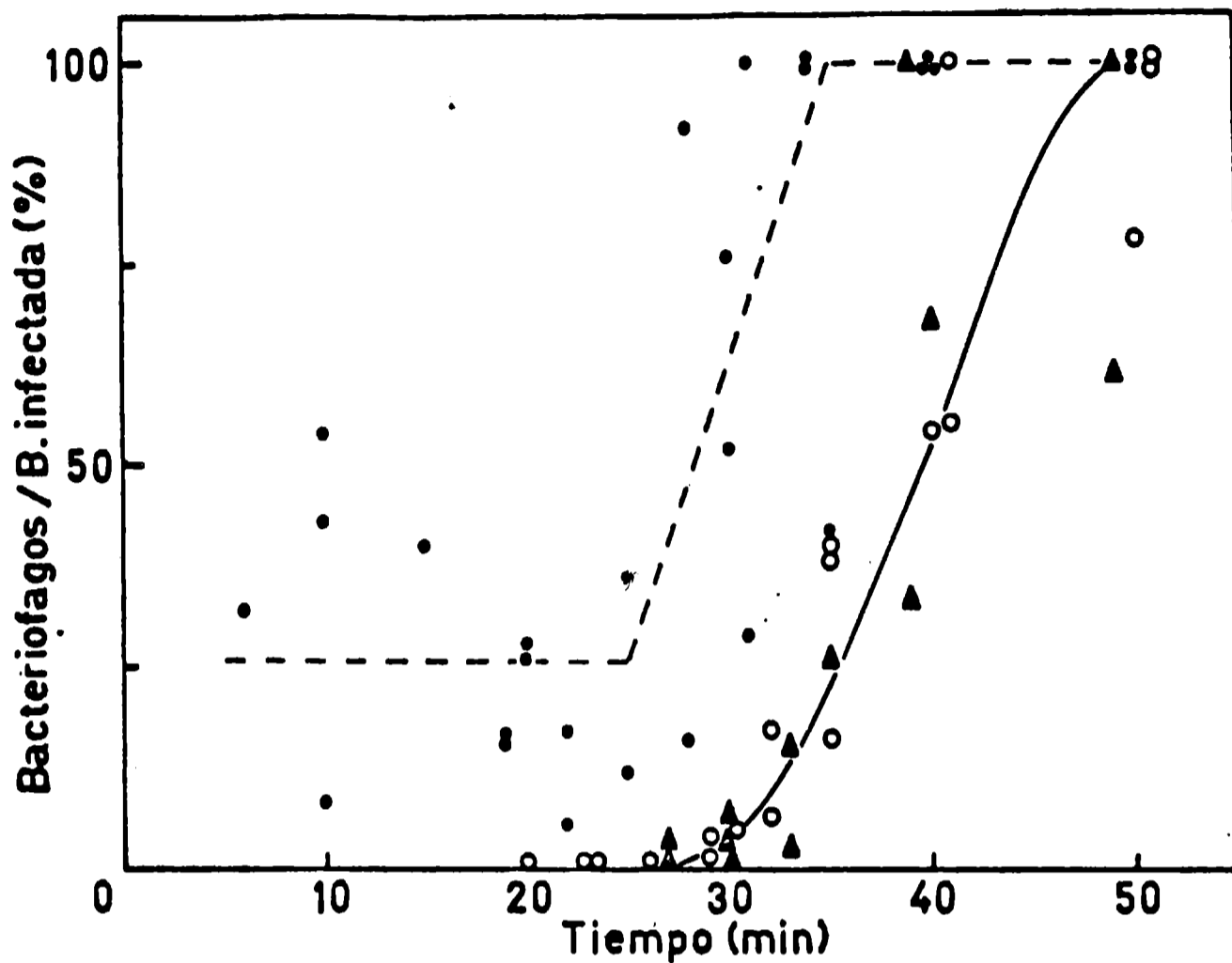


Figura 5. Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con SPO 1 silvestre a 37° C y transferido a 44° C o a medio con cloranfenicol.

A distintos tiempos después de la infección, alícuotas del cultivo a 37° C fueron diluidas en medio a 44° C (●) o en medio a 37° C conteniendo 0.1 mg/ml de cloranfenicol (▲), donde la incubación continuó por 60 minutos. Los bacteriofagos intracelulares (○) fueron determinados de acuerdo a Materiales y Métodos.

Los resultados se expresan como porcentaje del rendimiento obtenido cuando el cultivo permanece a 37° C (sin agregado de cloranfenicol). En cuatro experimentos, el rendimiento a 37° C fue 36, 82, 25 y 50 bacteriofagos/bacteria infectada. El mayor blanco experimental (bacteriofagos libres) fue 1 %.

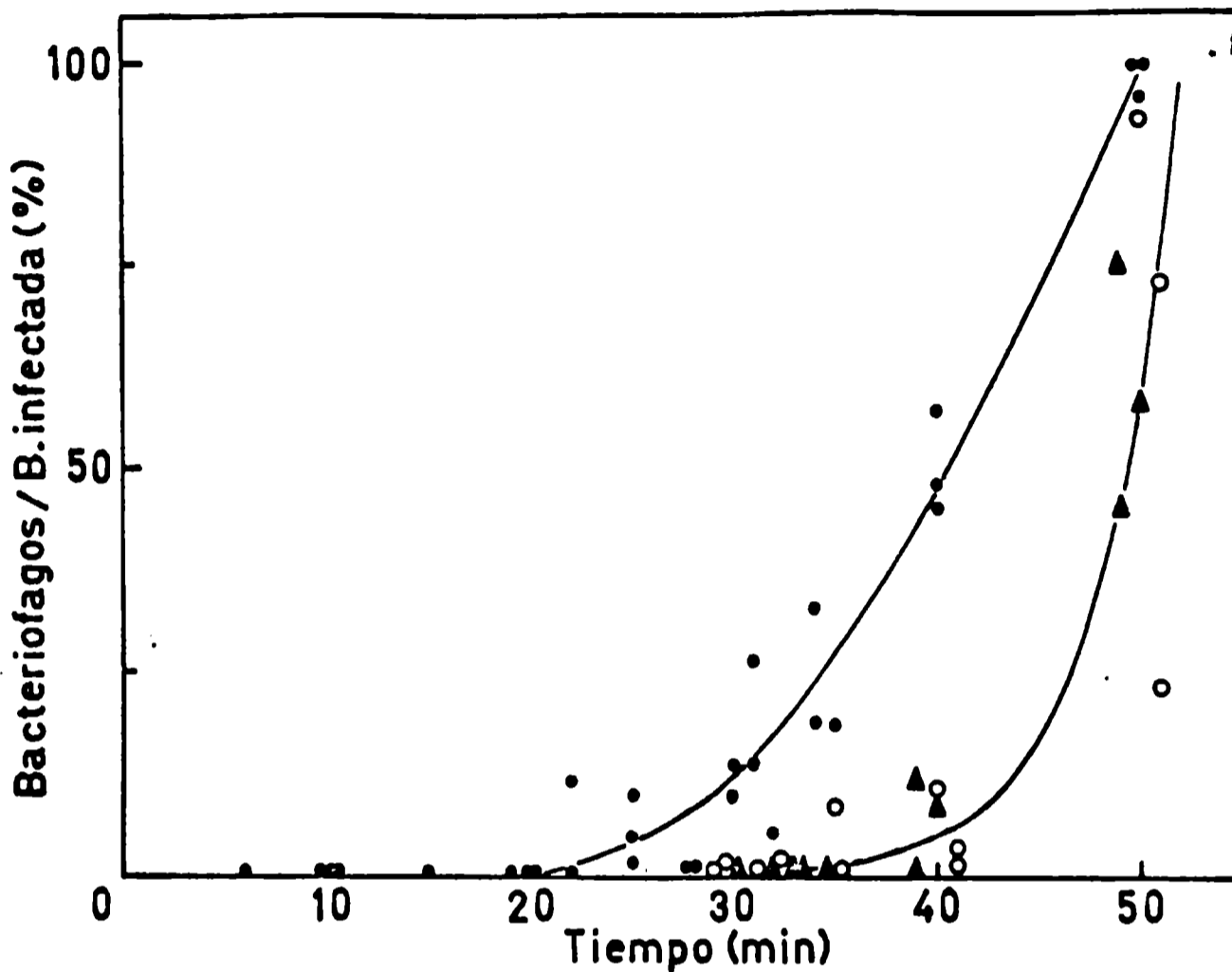


Figura 6. Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 37° C y transferido a 44° C o a medio con cloranfenicol.

A distintos tiempos después de la infección, alícuotas del cultivo a 37° C fueron diluídas en medio a 44° C (●) o en medio a 37° C conteniendo 0.1 mg/ml de cloranfenicol (▲), donde la incubación continuó por 60 minutos. Los bacteriofagos intracelulares (○) fueron determinados como se describió en Materiales y Métodos.

Los resultados se expresan como porcentaje del rendimiento obtenido cuando el cultivo permanece a 37° C (sin agregado de cloranfenicol). En cuatro experimentos, el rendimiento a 37° C fue 60, 5, 9 y 24 bacteriofagos/bacteria infectada. El mayor blanco experimental fue 0.5 %.

producción de bacteriofagos por *B. subtilis* infectado con SPO 1 silvestre.

Se ha observado un efecto similar cuando se realizó este experimento con *B. subtilis* HA 101 B infectado con SPO 1 silvestre; en ese caso también existe una disminución variable en el rendimiento cuando la elevación de la temperatura se produce hasta 25 minutos después de la infección (Añón, 1974).

La sensibilidad parcial del tipo silvestre a la transición térmica no impide su utilización como control positivo para los experimentos similares efectuados con el mutante ts-14-1. En efecto, ts-14-1, durante los primeros 20 minutos después de la infección, es sensible a la transición desde 37 a 44° C en un grado tal que la producción de bacteriofagos se reduce siempre en un factor superior a 100 (Figura 6).

Cabe agregar que SPO 1 silvestre no muestra sensibilidad a la temperatura cuando se lo titula sobre *B. subtilis* 168 M, HA 101 A o HA 101 B, en medio sólido, a 37 y a 44° C. En cambio, en experimentos en medios líquidos se aprecia que el rendimiento, en bacteriofagos por bacteria infectada, es menor a 44° C que a 37° C, independientemente de la cepa bacteriana utilizada, 168 M, HA 101 A, HA 101 B (Añón, 1974). Esta sensibilidad a la temperatura, en medio líquido, es relativamente pequeña, menor que la observada en la Figura 5.

La transición desde condiciones permisivas a un medio en el que la síntesis de proteínas está inhibida, detiene la producción de bacteriofagos. En efecto, la producción de bacteriofagos luego de dicha transición es similar al número de bacteriofagos presentes dentro de la bacteria al momento de la transición (Figura 5). Este resultado indica que en *B. subtilis* infectado con SPO 1 no existen precursores ensamblables en ausencia de síntesis de proteínas; es decir, que la producción de bacteriofagos requiere síntesis de proteínas concomitante. Este efecto no se debe a toxicidad del inhibidor sobre SPO 1, puesto que SPO 1 incubado durante 60 minutos en presencia de cloranfenicol (en la concentración usada en estos experimentos), no



presenta disminución en su capacidad para formar placas de lisis sobre *B. subtilis* 168 M.

Cuando el experimento de transición térmica se realiza con bacterias infectadas con el mutante ts-14-1 (Figura 6), los resultados indican que si la transición se efectúa durante los primeros 20 minutos después de la infección, no hay producción de bacteriofagos por encima de los ya presentes en la bacteria al tiempo de elevar la temperatura. A partir de los 20 minutos, la producción de bacteriofagos comienza a ser superior al número de partículas virales existentes al momento del cambio de temperatura y va creciendo hasta llegar a igualar al rendimiento que muestra el cultivo no transferido a temperatura no permisiva. Esta situación se alcanza alrededor de los 50 minutos después de la infección, que es el tiempo aproximado de lisis para este mutante en *B. subtilis* 168 M a 37° C.

Estos resultados muestran que el efecto del gen 31 comienza a ser detectable alrededor de los 20 minutos después de la infección pero es requerido durante todo el ciclo vegetativo de SPO 1 para obtener un rendimiento máximo de bacteriofagos por bacteria infectada. Es decir que, por una parte, la función del gen 31 tiene efecto "de disparo" sobre el desarrollo de SPO 1, puesto que el requerimiento es total hasta un determinado momento y de ahí en más es sólo parcial. Por otra parte, el efecto de la función es, de algún modo, agotable, pues debe estar activa durante todo el ciclo de vida para asegurar una progenie tan abundante como la que se obtiene cuando no se inactiva la función por transición térmica.

Debe tenerse presente que la determinación del tiempo mínimo necesario para visualizar el efecto del gen 31 no implica la localización temporal de los procesos por los cuales el gen es transcrito, traducido y su producto puesto en condiciones de desarrollar su acción.

Por otra parte, el requerimiento de actividad del gen 31 se extiende hasta el momento en que ts-14-1 comienza la replicación activa de su genoma. Esta coincidencia es atrayente, dado que ts-14-1

es defectivo en replicación en condiciones no permisivas.

Con respecto al efecto que tiene la transición desde condiciones permisivas a medio con inhibidor de síntesis de proteínas, es el mismo que se observa con el tipo silvestre y que ya se ha analizado.

#### B. Transiciones desde condiciones no permisivas a permisivas.

Una vez establecido el tiempo mínimo que la función del gen 31 debe permanecer activa (a 37° C) para permitir la producción de bacteriofagos luego de cambiar la temperatura a 44° C, tratamos de determinar cuál es el tiempo máximo que puede permanecer B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C, sin afectar la producción de bacteriofagos al bajar la temperatura a 37° C. Estos experimentos se realizaron también con SPO 1 silvestre, como control.

La infección de B. subtilis 168 M a 44° C con el tipo silvestre de SPO 1, seguida de rápidos descensos en la temperatura de incubación a 37° C y determinación del número de bacteriofagos por bacteria infectada 60 minutos después del cambio térmico, dió los resultados que se muestran en la Figura 7. Puede apreciarse que SPO 1 silvestre no es afectado por la incubación a 44° C, hasta 30 minutos después de la infección (no se realizaron transiciones más allá de los 30 minutos debido a que poco después de ese tiempo comienza la lisis bacteriana). Además, debe señalarse que en estas condiciones el rendimiento obtenido es mayor que cuando todo el ciclo transcurre a 44° C y del mismo orden que cuando todo el ciclo transcurre a 37° C.

Este comportamiento del tipo silvestre de SPO 1 lo constituye en un apropiado control positivo para este tipo de experimento.

Cuando las bacterias infectadas con ts-14-1, a 44° C, son transferidas a 37° C hasta 15 minutos después de la infección, la producción de bacteriofagos es alta, incluso mayor que la obtenida cuando todo el ciclo transcurre a temperatura permisiva. Si el tiempo de permanencia a temperatura no permisiva es mayor de 15 minutos, la producción de bacteriofagos comienza a disminuir (es de alrededor

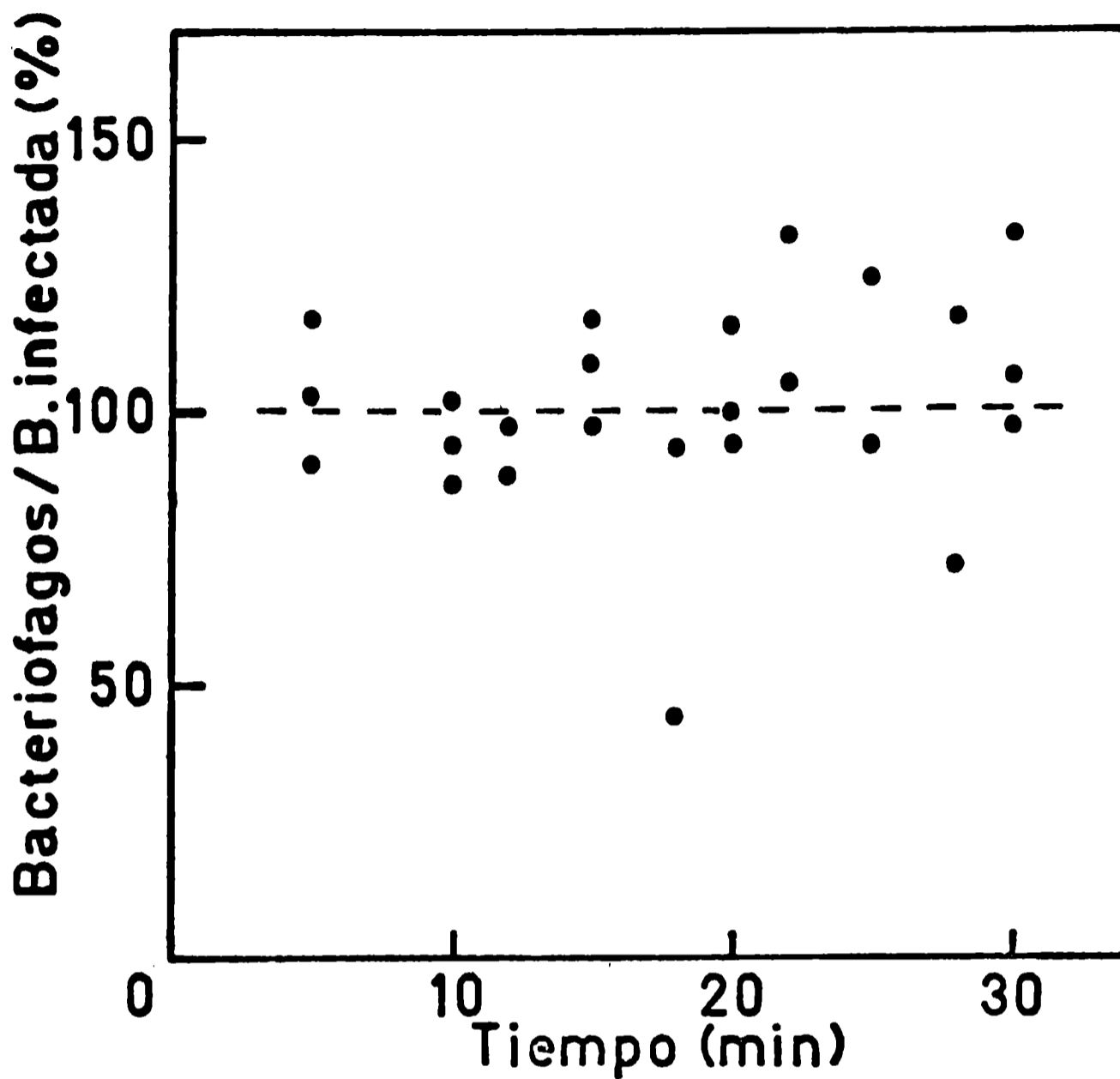


Figura 7. Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con SPO 1 silvestre a 44° C y transferido a 37° C.

A distintos tiempos después de la infección, alícuotas del cultivo a 44° C fueron diluidas en medio a 37° C, donde la incubación continuó por 60 minutos.

Los resultados se expresan como porcentaje del rendimiento promedio obtenido cuando la transición térmica se realizó hasta 15 minutos post-infección, a efectos de una comparación directa con los de la Figura 8. En tres experimentos, el 100 % fue 58, 72 y 36 bacteriofagos/bacteria infectada. El mayor blanco experimental fue 0.3 %.

El promedio de las 25 transiciones presentadas fue 100 % (error típico de la media: 4).

de 50 % a los 20 minutos) y es muy pequeña luego de los 30 minutos (Figura 8).

Es decir que el sistema, constituido por *B. subtilis* 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C, recupera íntegramente la capacidad productora de bacteriofagos si se lo coloca en condiciones permisivas luego de mantenerlo hasta 15 minutos a temperatura no permisiva. Sin embargo, a partir de 15 minutos, va perdiendo esa capacidad y a los 30 minutos la recuperación es mínima. De manera que el efecto de la función del gen 31 puede ser "esperado" hasta los 15 minutos post-infección a 44° C; o bien, el sistema es plenamente "rescatable", como productor de bacteriofagos, siempre que no permanezca a temperatura no permisiva más de 15 minutos después de la infección.

#### C. Análisis de los resultados.

Un análisis más detallado de los resultados presentados en los apartados II A y B, permite establecer lo siguiente:

1. La función del gen 31, afectada en el mutante ts-14-1, debe expresarse necesariamente hasta el 20º minuto después de la infección a 37° C, para asegurar la producción de bacteriofagos. Si se impide la expresión de la función del gen 31 luego de los 20 minutos post-infección se obtiene una progenie relativamente escasa. Para lograr una progenie comparable en número a la obtenida en condiciones permisivas la función debe expresarse hasta el final del ciclo lítico (Figura 6). Este comportamiento puede deberse a que:

- en este mutante, el producto del gen 31 (gp31) sea sensible a la temperatura, y que haya producido su efecto al cabo del 20º minuto a 37° C, por lo que deja de ser requerido (al menos parcialmente) luego de ese tiempo. La síntesis del producto del gen 31 podría ser o no ser sensible a la temperatura;
- el producto del gen 31 no sea sensible a la temperatura, pero sí lo sea su síntesis. Al cabo de 20 minutos a 37° C el producto habría sido sintetizado en una cantidad tal que asegura la producción de bacteriofagos, aún a temperatura no permisiva.

2. En este mutante, el gen 31 no es indispensable en condiciones de

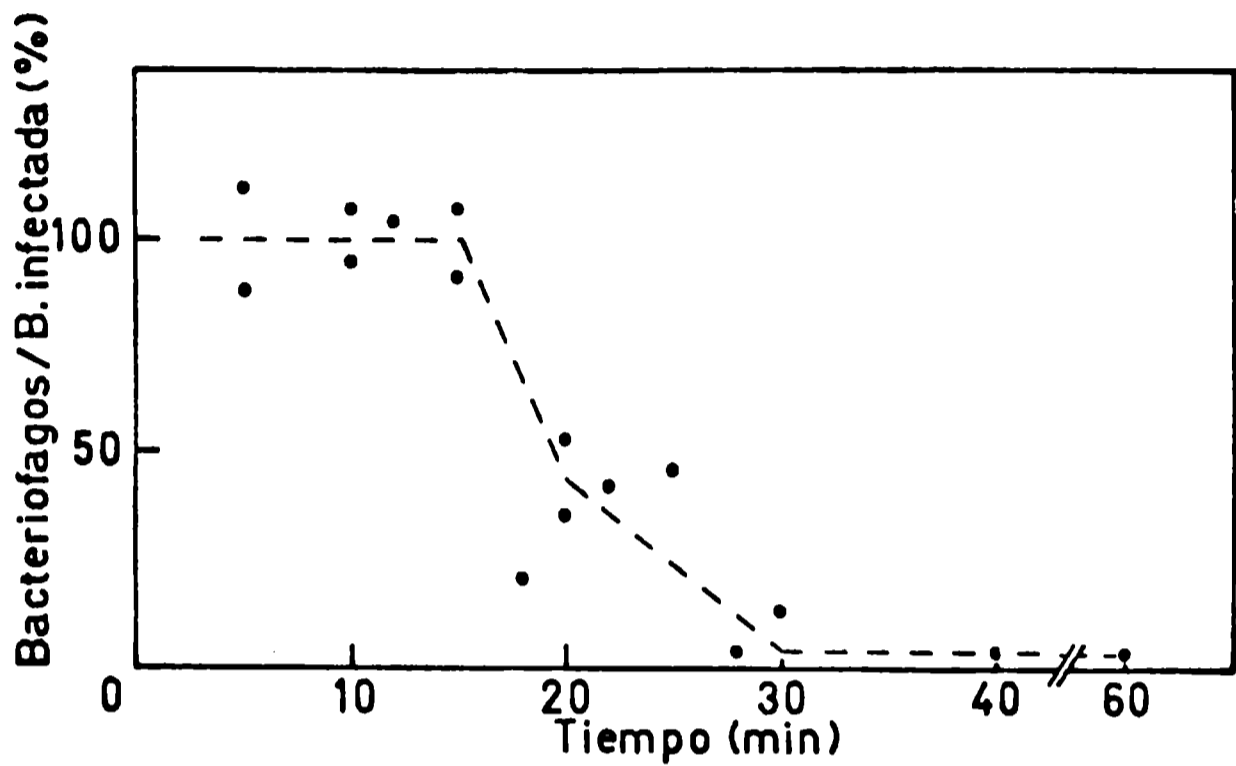


Figura 8. Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y transferido a 37° C.

A distintos tiempos después de la infección, alícuotas del cultivo a 44° C fueron diluídas en medio a 37° C, donde la incubación continuó por 60 minutos.

Los resultados se expresan como porcentaje del rendimiento promedio obtenido cuando la transición térmica se realizó hasta 15 minutos post-infección. En dos experimentos, el 100 % fue 30 y 69 bacteriofagos/bacteria infectada. El mayor blanco experimental fue 0.2 %.

funcionalidad durante los primeros 15 minutos después de la infección a 44° C (su no expresión no compromete la producción de bacteriofagos; Figura 8). Este comportamiento puede atribuirse a que:

- la síntesis del producto del gen 31 tiene lugar después de los 15 minutos a 44° C, independientemente de que el producto y/o su síntesis sea/n sensible/s a la temperatura;
- el producto del gen 31 ya se ha sintetizado a los 15 minutos a 44° C, pero su acción transcurre más allá de ese tiempo. En este caso, el producto debe ser sensible a la temperatura y, eventualmente, puede ser competidor del producto que se sintetice a temperatura permisiva.

Debe aclararse el sentido que se da aquí a la expresión "producto sensible a la temperatura". Con ella se quiere indicar que la actividad biológica del producto es menor a temperatura no permisiva que a temperatura permisiva; la disminución de su actividad puede estimarse por la caída en el rendimiento obtenido de bacterias infectadas a 44° C respecto a 37° C, que para ts-14-1 es de 0.2 y 30 bacteriofagos por bacteria infectada, respectivamente (Añón, 1974); o sea que el daño térmico de la función del gen 31 se traduce en una caída de 150 veces, aproximadamente en la producción de bacteriofagos.

Según lo que hemos expresado, el carácter de sensible a la temperatura de la mutación del gen 31 presente en ts-14-1 puede deberse a que gp31, o su síntesis, o ambos, sean sensibles a la temperatura.

Como acabamos de ver, cada una de estas tres posibilidades implica ciertos tiempos para la síntesis y la acción del producto del gen 31, que armonicen con los resultados presentados hasta este momento.

#### D. Combinación de transiciones entre condiciones permisivas y no permisivas.

Una manera de determinar cuál de las tres alternativas

planteadas es la que ocurre en el mutante ts-14-1, consiste en combinar apropiadamente transiciones desde condiciones permisivas a no permisivas y viceversa, utilizando temperatura, inhibición de la síntesis de proteínas y tiempo como variables. Con ese objetivo se diseñaron los experimentos de la Figura 9.

Obviamente, estos experimentos constituyen sólo algunas de las combinaciones que pueden realizarse. Se eligieron estos casos porque resultan el menor número de experimentos que podrían "a priori", responder a las cuestiones planteadas.

Los experimentos consisten esencialmente en infectar *B. subtilis* 168 M con el mutante ts-14-1 a temperatura no permisiva y mantener dicha temperatura hasta los 15 minutos. A este tiempo se baja bruscamente la temperatura hasta 37° C con o sin el agregado simultáneo de cloranfenicol al cultivo. Luego de 5, 10 o 15 minutos se vuelve a elevar rápidamente la temperatura hasta 44° C, con dilución del antibiótico, en caso que se lo hubiera agregado en el momento del descenso de temperatura. Luego de 60 minutos de realizada la última transición, se determina el número de bacteriofagos producidos (Figura 9, líneas 1 a 6).

Se requiere una serie de controles previos, que prueben que estas manipulaciones no dañan por sí mismas al sistema de modo irreversible. Asimismo, la expresión de los resultados requiere la realización simultánea de experimentos que representen los niveles mínimo y máximo de la producción de bacteriofagos. A su vez, ese nivel mínimo será significativo siempre que el blanco experimental, dado por los bacteriofagos libres, sea suficientemente bajo.

Cuando el experimento se desarrolló a 37° C (Figura 9, líneas 7, 8 y 9), el agregado de cloranfenicol, seguido de su dilución al cabo de un lapso limitado, redujo la producción de bacteriofagos a aproximadamente un 10 % del control sin antibiótico. En cambio, si no se diluye el cloranfenicol, la inhibición de la producción de progenie es completa. Además, el blanco del experimento es 0.03 % respecto al rendimiento del cultivo control. En general, estos blancos

	Diseño Experimental 0 15 T T+60 (mL/R)	Rendimiento (%)		
		T=20	T=25	T=30
1		0.27	0.17	0.24
2		100	100	100
3		0.00	0.00	0.00
4		27	30	23
5		11	17	18
6		2.4	2.4	3.7
7				100
8				0.00
9				9.7

Figura 9. Producción de bacteriofagos por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 y sometido a transiciones entre condiciones permisivas y no permisivas.

Se infectó B. subtilis 168 M con ts-14-1 a 44° C (líneas 1 a 6) o a 37° C (líneas 7 a 9). Luego de 15 minutos, los cultivos fueron diluidos 10 veces en los siguientes medios: CHT a 44° C (línea 1); CHT a 37° C (líneas 2, 5 y 7) y CHT a 37° C conteniendo 0.1 mg/ml de cloranfenicol (líneas 3, 4, 6, 8 y 9). Cinco, diez o quince minutos después (T minutos después de la infección), los cultivos fueron diluidos de la siguiente manera: 10 veces en CHT a 44° C (línea 1); 100 veces en CHT a 37° C (líneas 2, 4, 7 y 9); 10 veces en CHT a 37° C conteniendo 0.1 mg/ml de cloranfenicol (líneas 3 y 8) y 100 veces en CHT a 44° C (líneas 5 y 6).

Sesenta minutos después de la última transición se determinó la producción de bacteriofagos en cada caso.

Los resultados de las líneas 1 a 6 corresponden a experimentos realizados en paralelo y se expresan como porcentaje del rendimiento obtenido en la línea 2 (71 bacteriofagos/bacteria infectada). Los resultados de las líneas 7 a 9 corresponden a experimentos realizados en paralelo y se expresan como porcentaje del rendimiento obtenido en la línea 7 (60 bacteriofagos/bacteria infectada).

Los blancos experimentales (bacteriofagos libres) fueron 0.06 y 0.03 % para las líneas 1 a 6 y 7 a 9, respectivamente.



bajos, es decir, una buena infección, se obtienen cuando se trabaja con multiplicidades de infección bajas (menores de un bacteriofago/bacteria) y con bacteriofagos producidos recientemente, o sea, con lisados nuevos y no purificados por centrifugación a alta velocidad.

Tenemos, entonces, buenos controles iniciales, dados por blancos bajos, inhibición muy eficaz por el cloranfenicol y una aceptable recuperación de la capacidad de producir progenie cuando el antibiótico se remueve del medio de cultivo hasta 15 minutos después de haberlo agregado.

Sobre la base de estos resultados se realizaron los experimentos de la Figura 9, líneas 1 a 6. Para ellos se ha tomado como control positivo el rendimiento obtenido cuando al cultivo infectado a 44° C, se lo transfiere a 37° C a los 15 minutos después de la infección. Esto no es sino un experimento como el de la Figura 8; por lo tanto, se espera una producción alta de bacteriofagos. Efectivamente, se obtuvieron 71 bacteriofagos/bacteria infectada, valor que se toma como 100 % (Figura 9, línea 2).

El control negativo está representado por la producción obtenida cuando todo el ciclo transcurre a temperatura no permisiva. Como puede apreciarse, en esas condiciones las progenies representaron entre 0.17 y 0.27 % del control positivo (Figura 9, línea 1).

El control positivo es así unas 350 veces mayor que el negativo, de manera que la escala de detección para el experimento es suficientemente amplia.

Por otra parte, el blanco del experimento es 0.06 % (0.04 bacteriofagos/bacteria infectada); este valor es de 3 a 5 veces menor que el del control negativo.

El efecto inhibitorio del cloranfenicol se probó por agregado del antibiótico simultáneamente al descenso de la temperatura de incubación (Figura 9, línea 3). La producción de bacteriofagos fue completamente anulada, hasta el punto de resultar menor que el blanco experimental (bacteriofagos libres). Este efecto del

cloranfenicol ha sido observado reiteradamente; sin embargo, como ya se ha dicho, no se debe a un efecto tóxico de la droga sobre bacteriofagos maduros.

Si el cloranfenicol se remueve del medio de incubación luego de 5, 10 o 15 minutos desde su agregado, el sistema (B. subtilis infectado con el mutante ts-14-1) recupera parcialmente su capacidad de producir progenie. Esta recuperación es de aproximadamente un 25 % respecto al control positivo, pero representa una producción 100 veces mayor que la obtenida en condiciones no permisivas. Además, la recuperación es aparentemente independiente, en magnitud, del lapso durante el cual el antibiótico estuvo presente (Figura 9, línea 4).

Consideremos ahora el caso en que, 15 minutos después de la infección a 44° C, se baja rápidamente la temperatura de incubación hasta 37° C y se la mantiene por espacio de 5, 10 o 15 minutos. Al cabo de esos lapsos, se vuelve a elevar la temperatura hasta la no permisiva y 60 minutos después se determina la producción de bacteriofagos.

Los resultados , Figura 9, línea 5, indican que en estas condiciones el sistema produce bacteriofagos, con rendimientos entre un 10 y un 20 %, respecto al control positivo. Por otra parte, la producción de bacteriofagos en el experimento que estamos considerando es unas 40 a 100 veces mayor que la obtenida en condiciones no permisivas, es decir, cuando no se permite al sistema una "ventana" de temperatura permisiva. Además, parece haber una tendencia a una mayor producción cuando el tiempo a 37° C pasa de 5 a 15 minutos; sin embargo, el error de estas determinaciones, ya discutido (ver página 30), no permite establecer como significativas las diferencias observadas aquí (11 % para una "ventana" de 5 minutos, 18 % para una "ventana" de 15 minutos; Figura 9, línea 5).

Estos resultados muestran que son suficientes 5 minutos a 37° C, luego de 15 minutos a 44° C, para que se produzcan bacteriofagos, aunque la temperatura, luego de esos 5 minutos, vuelva a ser la no permisiva. De modo que 5 minutos de síntesis y/o acción del

producto del gen 31 alcanzan para la prosecución del ciclo lítico, que se traduce en una progenie de regular abundancia.

Veamos ahora el caso en que se agrega cloranfenicol en el momento de bajar la temperatura y se lo remueve cuando se reeleva aquélla. Los resultados obtenidos (Figura 9, línea 6) indican que hay producción de bacteriofagos cuando se permite al sistema una "ventana" a 37° C con inhibición de la síntesis de proteínas. Este comportamiento implica que la síntesis de gp31 no es sensible a la temperatura; que gp31 es sensible a la temperatura y reactivable por descenso de la misma.

Es conveniente formular algunos comentarios respecto a estos últimos resultados y las conclusiones extraídas de ellos.

El primero se refiere a la significación del resultado obtenido en el experimento de la Figura 9, línea 6. Un rendimiento de 2.4 a 3.7 % respecto al control positivo (línea 2) representa una real producción de bacteriofagos por encima de lo que se obtiene en el control negativo (línea 1), que es 10 veces menor.

Con respecto a la conclusión extraída (gp31 es sensible a la temperatura) puede llegarse a ella por exclusión de las alternativas. Dado que ts-14-1 es un mutante simple, puede ocurrir que el producto del gen mutado, o su síntesis, sean sensibles a la temperatura o que lo sean ambos. Si la síntesis de gp31 fuera termosensible, no se obtendría progenie en el experimento que analizamos, puesto que en su transcurso no hay momento en que la temperatura sea permisiva y a la vez no haya cloranfenicol. Dado que hubo progenie en tales condiciones, queda claro que gp31 es sensible a la temperatura, en ts-14-1.

Por otra parte, la síntesis de gp31 debe haber comenzado antes de los 15 minutos a 44° C, de manera que al momento de bajar la temperatura haya una cantidad de producto que permita una producción de bacteriofagos como la observada. Asimismo, el producto inactivo a 44° C es reactivable al pasar a 37° C y bastan 5 minutos a esta temperatura para que el producto reactivado desarrolle una acción

suficiente para permitir una producción de bacteriofagos limitada, pero significativa si se la compara con la que se obtiene en condiciones no permisivas.

Resumiendo, podemos puntualizar las siguientes características de la mutación presente en ts-14-1:

- la síntesis del producto del gen 31 no es sensible a la temperatura;
- el producto del gen 31 es sensible a la temperatura;
- el producto sintetizado a temperatura no permisiva es reactivable por descenso de la temperatura hasta la permisiva;
- la síntesis del producto del gen 31 comienza antes de los 15 minutos a 44° C y al cabo de 15 minutos se ha sintetizado en cantidad tal que asegura la producción de algunos bacteriofagos;
- la acción del producto comienza antes de los 20 minutos (15 minutos a 44° C más 5 minutos a 37° C) y al cabo de ese tiempo dicha acción es suficiente para obtener progenie.

### III. INFLUENCIA DEL GEN 31 SOBRE LA REPLICACION Y LA TRANSCRIPCION.

En condiciones no permisivas, o sea a 44° C, el mutante ts-14-1 es defectivo en la replicación de su genoma y en la síntesis de RNAs intermedios y tardíos (Añón, 1974). Este último defecto se manifiesta luego de los 10 minutos después de la infección e implica un déficit en 3 de las clases de mRNAs de SPO 1 (Gage & Geiduschek, 1971 a) :  $m_1$ ,  $m_2$  y  $l$ .

Como hemos visto, si 15 minutos después de la infección a 44° C se transfiere el sistema a temperatura permisiva por un lapso de 5 minutos, al cabo del cual se restituye la condición no permisiva, hay producción de bacteriofagos. Este hecho señala la obligatoria recuperación, en esas condiciones, de la capacidad de síntesis de DNA y RNAs virales, hasta niveles compatibles con la existencia de prole.

Sin embargo, no sabemos si la replicación y la transcripción se recuperan simultáneamente o no, si la recuperación se produce inmediatamente después de establecida la condición permisiva o si, por el contrario, se requiere que gp31 actúe un cierto tiempo para detectar su efecto sobre la síntesis de polinucleótidos. Tampoco sabemos si la transcripción y la replicación, una vez recuperadas, se mantienen aunque gp31 sea inactivado (por elevación de la temperatura) o si se requiere la acción sostenida del producto para el mantenimiento de la síntesis de ácidos nucleicos virales. Pueden formularse otras preguntas, especialmente con respecto a la transcripción, referidas, por ejemplo, a la calidad y abundancia relativa de los mRNAs transcriptos.

Los experimentos que siguen fueron realizados con el propósito de aclarar algunas de las cuestiones que acaban de plantearse. Se ha medido la síntesis de DNA y de RNA en bacterias infectadas con ts-14-1 a 44° C, a las que se transfirió a 37° C a los 15 minutos después de la infección. En algunos casos, luego de un cierto lapso de tiempo a temperatura permisiva, se volvió a elevar la

temperatura a 44° C. Se trata de los diseños experimentales de las líneas 2 y 5 de la Figura 9; en estas condiciones, la progenie es 100 y 10-20 % respecto al caso en que no se reeleva la temperatura (Figura 9). Se ha preferido este diseño a aquél en el que se agrega cloranfenicol (Figura 9, línea 6), porque, siendo mayor la producción de bacteriofagos, se espera que sean mayores los efectos del producto del gen 31 sobre la síntesis de DNA y RNA y, por lo tanto, mejores las posibilidades de medirlos.

#### A. Influencia del gen 31 sobre la replicación.

Para medir síntesis de DNA se infectó *B. subtilis* 168 M con ts-14-1 a 44° C, se agregó <sup>3</sup>H-Adenina y se tomaron muestras de los siguientes cuatro sub-cultivos: uno que permaneció a 44° C; uno que fue transferido a 37° C a los 15 minutos; dos, derivados del anterior, que fueron transferidos nuevamente a 44° C a los 20 y 30 minutos. Los resultados de incorporación de <sup>3</sup>H-Adenina en DNA se presentan en la Figura 10.

Cuando la temperatura de incubación se mantiene a 44° C, no hay síntesis de DNA, en concordancia con el carácter DO de ts-14-1 y su capacidad para reprimir irreversiblemente la replicación bacteriana (Añón, 1974).

Si se baja la temperatura a los 15 minutos post-infección, la síntesis de DNA se inicia a los 22 minutos, tiempo que puede considerarse normal, pues a 37° C lo hace a los 20 minutos (Figura 3).

Cuando la temperatura vuelve a elevarse a 44° C la replicación se detiene, pero no lo hace inmediatamente, sino luego de unos 10 minutos. Además, el nivel final que alcanza la síntesis de DNA es mayor cuando la "ventana" de 37° C es de 15 minutos que cuando es de 5 minutos.

Estos resultados indican que la reactivación de gp31 15 minutos después de la infección a 44° C posibilita la replicación del genoma viral y la cantidad de DNA sintetizado es proporcional a la extensión del período de acción de gp31.

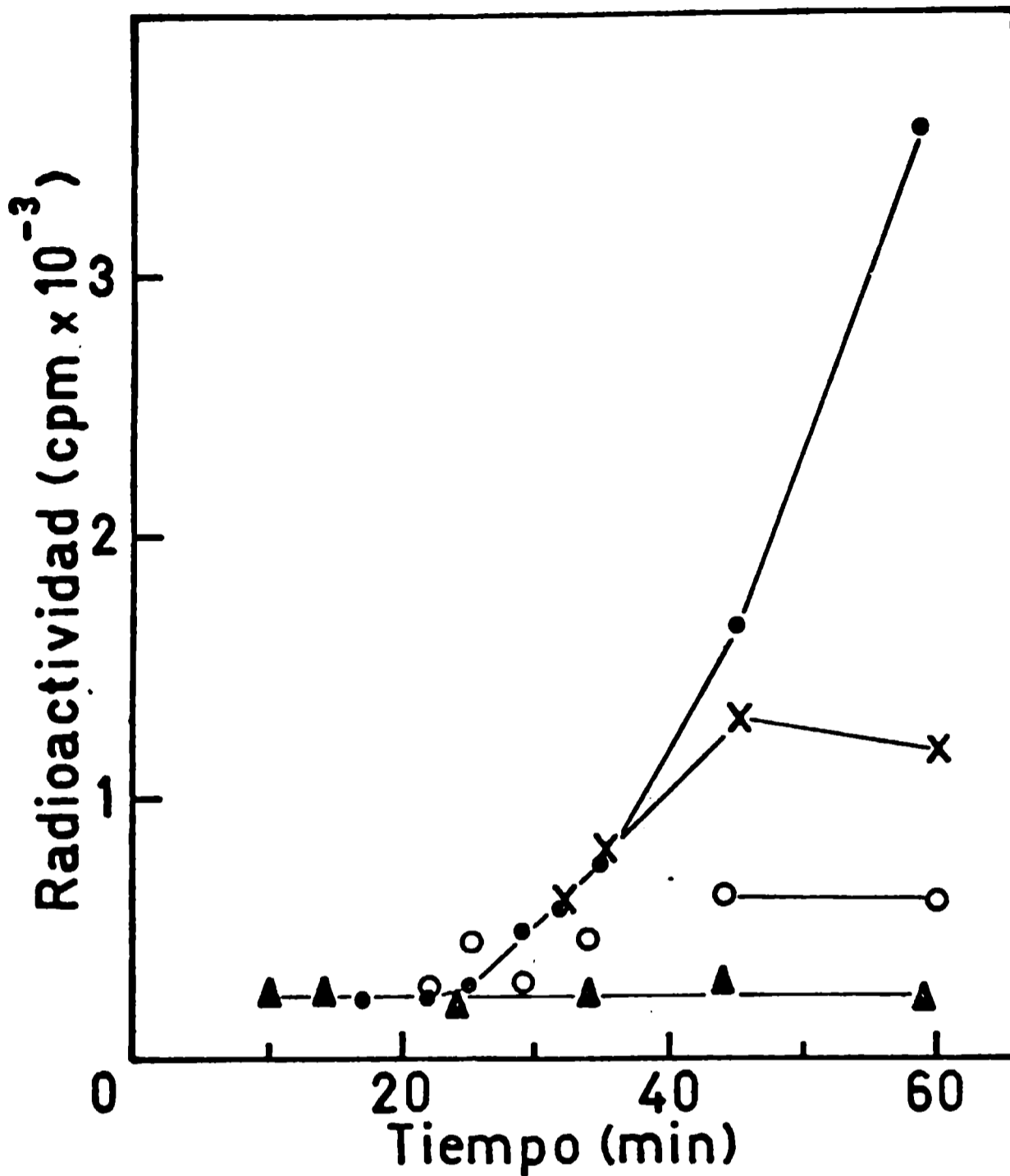


Figura 10. Incorporación de <sup>3</sup>H-Adenina en DNA por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y sometido a transiciones térmicas.

A los 8 minutos post-infección se agregó al cultivo <sup>3</sup>H-Adenina (5  $\mu$ Ci/ml y 17  $\mu$ g/ml). Una fracción del cultivo permaneció a 44° C (▲) y otra se transfirió a 37° C a los 15 minutos. De esta última, una parte permaneció a 37° C (●); otras dos se retransfirieron a 44° C a los 20 (○) y 30 (x) minutos respectivamente. De cada uno de los cuatro subcultivos se tomaron muestras de 0.5 ml que fueron procesadas como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de bacterias no infectadas fue 0.1.

Los efectos de la activación y de la inactivación de gp31 sobre la replicación no se manifiestan en forma inmediata. El primero de ellos puede ser temporalmente normal, como acaba de mencionarse, dado el fenotipo de ts-14-1 a 37° C. La demora en la manifestación del efecto de la inactivación de gp31 sobre la síntesis de DNA puede reconocer diferentes causas, con diversos grados de complejidad. Así, suponiendo que gp31 actúe en forma directa sobre el proceso de replicación, su actividad decrecería luego que se lo transfiriera a 44° C, de modo que al cabo de unos diez minutos su acción se agotaría. Otra posibilidad sería que gp31 actuara sobre la síntesis de un mRNA, cuyo producto (proteína) estuviera implicado en la replicación (téngase presente que ts-14-1 es defectivo en replicación y en transcripción). Si así fuera, la activación o inactivación de gp31 se reflejaría en la síntesis de DNA con una cierta demora; para el caso de la inactivación, tal demora involucraría el tiempo necesario para el agotamiento de gp31, del supuesto mRNA y de la proteína producto de él.

#### B. Influencia del gen 31 sobre la replicación en ausencia de transcripción.

La posibilidad mencionada anteriormente puede ser evaluada si se pone al sistema en condiciones en que la síntesis de RNA esté inhibida por un medio que no implique la inactivación de gp31. Para ello se realizó un experimento análogo al anterior, pero se agregó al cultivo, en el momento de bajar la temperatura a 37° C, un inhibidor de la transcripción, rifampicina (Lancini & Sartori, 1963).

Los resultados obtenidos muestran que, mientras la inhibición de la síntesis de RNA fue completa (Figura 11 B), la replicación se inició a los 22 minutos aproximadamente y continuó hasta los 55 minutos (Figura 11 A). Cuando se reelevó la temperatura a los 30 minutos, sin eliminar el antibiótico, la replicación continuó por unos 10 minutos más y luego cesó. Por lo tanto, la síntesis de DNA



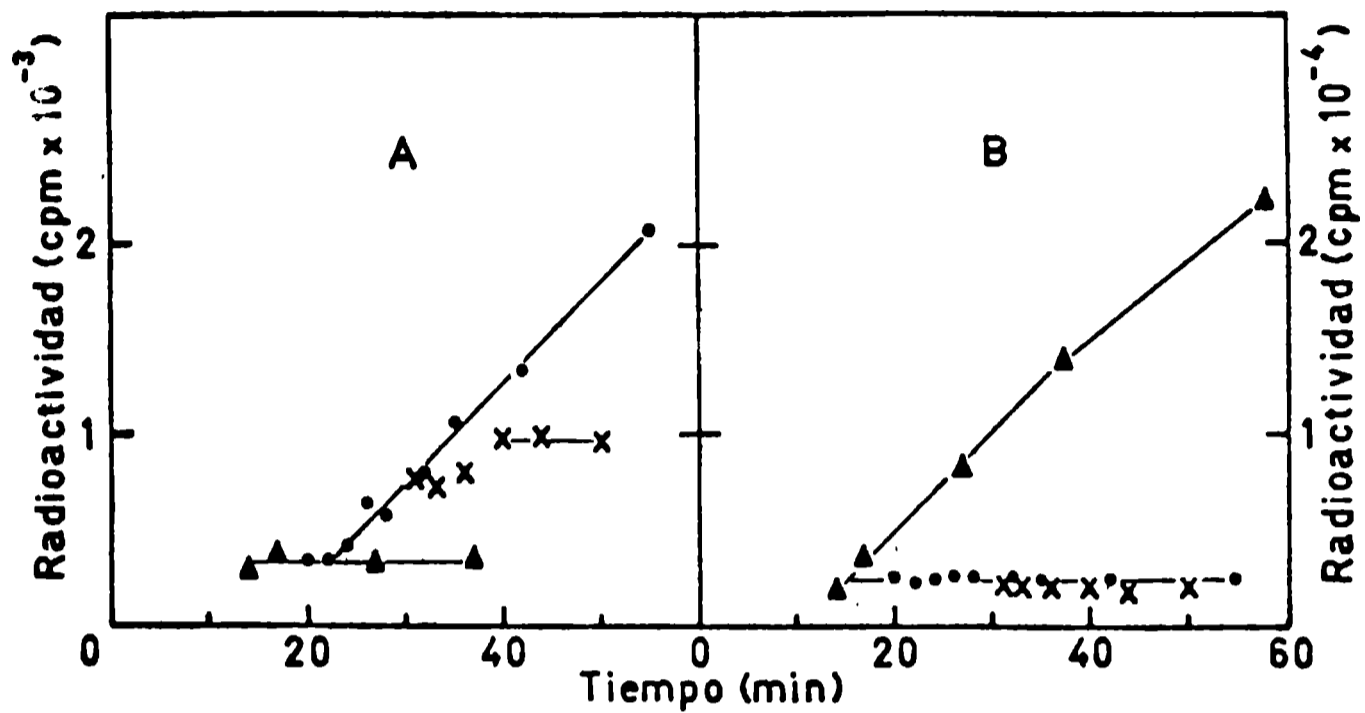


Figura 11. Incorporación de <sup>3</sup>H-Adenina en DNA y RNA por *B. subtilis* 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y sometido a transiciones térmicas en presencia de Rifampicina.

A los 8 minutos post-infección se agregó al cultivo <sup>3</sup>H-Adenina (3.8  $\mu$ Ci/ml y 19  $\mu$ g/ml). Una fracción del cultivo permaneció a 44° C (▲) y otra se transfirió a 37° C a los 15 minutos, agregándose simultáneamente RIF hasta 10  $\mu$ g/ml. De esta última, una parte permaneció a 37° C (●) y otra fue retransferida a 44° C a los 30 minutos (x).

De cada uno de los tres subcultivos se tomaron muestras de 0.5 ml que fueron procesadas para la determinación de radioactividad incorporada en material estable al álcali (DNA, parte A) e inestable al álcali (RNA, parte B) y precipitable por TCA, como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de bacterias no infectadas fue 1.

en estas condiciones transcurre tal como si no se hubiera inhibido la transcripción. Los niveles finales de incorporación de  $^3\text{H}$ -Adenina en DNA son del mismo orden con o sin inhibición de la síntesis de RNA (compárense Figuras 10 y 11 A, considerando que las actividades específicas de los precursores usados no son iguales).

Estos resultados indican que el efecto de gp31 sobre la replicación del genoma de SPO 1 no requiere transcripción concomitante, o sea que no está mediado por un RNA. Por lo tanto, 15 minutos después de la infección a  $44^\circ\text{C}$ , el sistema cuenta con todos los mRNAs necesarios para las funciones involucradas en la replicación, la cual está impedida por la inactividad de gp31 a  $44^\circ\text{C}$ . Al rescatarse la actividad de dicho producto la replicación se inicia sin necesidad de síntesis de RNA (Figura 11 A) y está limitada por el lapso de tiempo en que gp31 puede actuar y no por la transcripción viral (Figuras 10 y 11 A).

### C. Influencia del gen 31 sobre la transcripción.

La síntesis de RNA total se midió por incorporación de  $^3\text{H}$ -Adenina en material álcali lábil ácido precipitable, en un cultivo de *B. subtilis* 168 M infectado con ts-14-1 a  $44^\circ\text{C}$ , transferido a  $37^\circ\text{C}$  a los 15 minutos y al que se volvió a  $44^\circ\text{C}$  a los 20 o a los 30 minutos. Una parte del cultivo permaneció a  $37^\circ\text{C}$  desde los 15 hasta los 60 minutos y otra se mantuvo a  $44^\circ\text{C}$  desde la infección.

Los resultados se muestran en la Figura 12. Su interpretación no es sencilla, puesto que se trata de síntesis acumulativa de RNA total, es decir, viral y bacteriano.

Cuando el sistema permanece a  $44^\circ\text{C}$  el RNA sintetizado es preponderantemente bacteriano, ya que el nivel de transcripción viral es muy bajo luego de los 10 minutos a esta temperatura.

Al bajar la temperatura a los 15 minutos, la síntesis de RNA prosigue con menor velocidad; aquí se está midiendo transcripción bacteriana y, posiblemente, viral. Aparentemente, la recuperación de la actividad por parte del bacteriofago deprime la síntesis

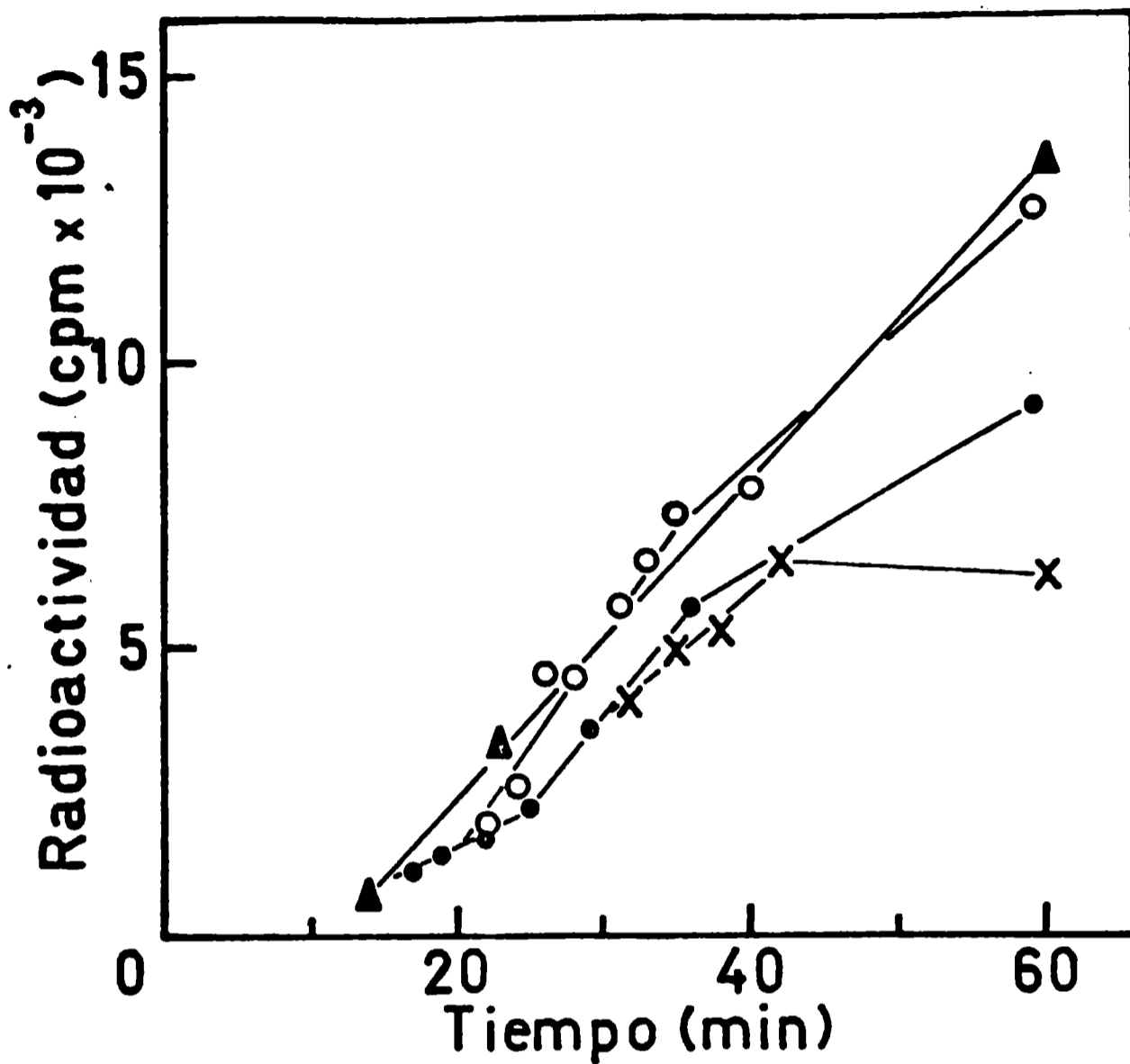


Figura 12. Incorporación de <sup>3</sup>H-Adenina en RNA por B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y sometido a transiciones térmicas.

A los 8 minutos post-infección se agregó al cultivo <sup>3</sup>H-Adenina (5  $\mu$ Ci/ml y 17  $\mu$ g/ml). Una fracción del cultivo permaneció a 44° C (▲) y otra se transfirió a 37° C a los 15 minutos. De esta última, una parte permaneció a 37° C (●); otras dos se retransfirieron a 44° C a los 20 (○) y 30 (x) minutos, respectivamente. De cada uno de los cuatro subcultivos se tomaron muestras de 0.5 ml que fueron procesadas según se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de bacterias no infectadas fue 0.7.

de RNA bacteriano.

Si la temperatura se eleva a  $44^{\circ}$  C a los 30 minutos (es decir, luego de una "ventana" de 15 minutos a  $37^{\circ}$  C), la síntesis de RNA prosigue durante unos 10 a 12 minutos y luego se detiene. Este comportamiento sugiere que al subir la temperatura se detiene la transcripción viral, aunque no inmediatamente y que, cuando la "ventana" es de 15 minutos, el bacteriofago recupera sus funciones al punto de reprimir irreversiblemente la síntesis de RNA de la bacteria.

En cambio, si la temperatura se eleva a  $44^{\circ}$  C 5 minutos después de haberla bajado, la síntesis de RNA no decae. Más bien, tiende al comportamiento del sistema a  $44^{\circ}$  C. Esto podría deberse a que el tiempo a  $37^{\circ}$  C (5 minutos) no es suficiente para que el bacteriofago anule irreversiblemente la transcripción bacteriana, por lo cual ésta se restituiría al volver a condiciones no permisivas, condiciones en las que volvería a inhibirse la síntesis de RNA viral. Resultados que se describen más adelante, apoyan estas interpretaciones.

Por lo tanto, una hipótesis compatible con estos resultados, sería la siguiente: El desarrollo del mutante ts-14-1, cuya prosecución es posible porque el producto del gen 31 recupera su actividad al bajar la temperatura, necesita más de 5 minutos (pero menos de 15) para reprimir irreversiblemente la síntesis de RNA de la bacteria y más de 15 minutos para sostener la transcripción viral.

Sin embargo, la situación no es clara, especialmente para el caso en que se permite al sistema una "ventana" de 5 minutos a temperatura permisiva. Una manera de obtener más información consiste en determinar qué proporción del RNA sintetizado corresponde a las especies codificadas por el bacteriofago.

Con este objeto se realizaron marcaciones por pulsos de 2 minutos, con  $^3$ H-Uracilo, a lo largo de un experimento en el que se permitió al sistema una "ventana" de 5 minutos a  $37^{\circ}$  C (entre los 15 y los 20 minutos después de la infección). Al final de cada pulso

se extrajeron los RNAs y se los hibridizó a DNA de SPO 1. En la Figura 13 se muestran los resultados de tales hibridizaciones.

Los RNAs marcados entre los 5 y 7 minutos y entre los 12 y 14 minutos después de la infección hibridizan a DNA de SPO 1 en proporciones de 20 y 3.3 % respectivamente. Estos niveles de hibridización son los habituales para esas condiciones experimentales (Añón, 1974).

Si se baja la temperatura de incubación a 37° C 15 minutos después de la infección, el nivel de hibridización a DNA de SPO 1 continúa muy bajo durante los 6 minutos siguientes; en efecto, el RNA marcado entre los 19 y 21 minutos después de la infección hibridiza a DNA viral en sólo un 1.8 %. Pero luego el nivel de hibridización comienza a aumentar (3.3 % para el RNA marcado entre los 22 y 24 minutos) y continúa creciendo hasta por lo menos 35 minutos, alcanzando valores del orden de 25 %.

Si luego de 5 minutos de permanencia a 37° C, el sistema se transfiere a 44° C, el nivel de transcripción viral experimenta una ligera recuperación, que comienza a los 21 minutos y prosigue hasta los 27 minutos. De ahí en más, el nivel de transcripción vuelve a bajar y regresa a los valores obtenidos antes de su recuperación.

Los resultados muestran que la reactivación del producto del cistrón 31 produce la recuperación de la síntesis de RNA viral, recuperación que se aprecia después que han transcurrido 7 minutos desde el momento en que se transfiere el sistema a 37° C. La inactivación posterior del producto del gen 31 se traduce en una reinhibición de la síntesis de RNA viral. Además, cuando se permite al sistema un lapso de sólo 5 minutos a 37° C, la recuperación de la transcripción viral se hace evidente después que la temperatura se ha reelevado y alcanza pequeña magnitud (el RNA marcado entre 25 y 27 minutos hibridiza a DNA de SPO 1 en un 3.4 %, mientras que si no se hubiera subido la temperatura el nivel habría sido 8.5 % aproximadamente). Sin embargo, esta leve recuperación de la síntesis de RNA

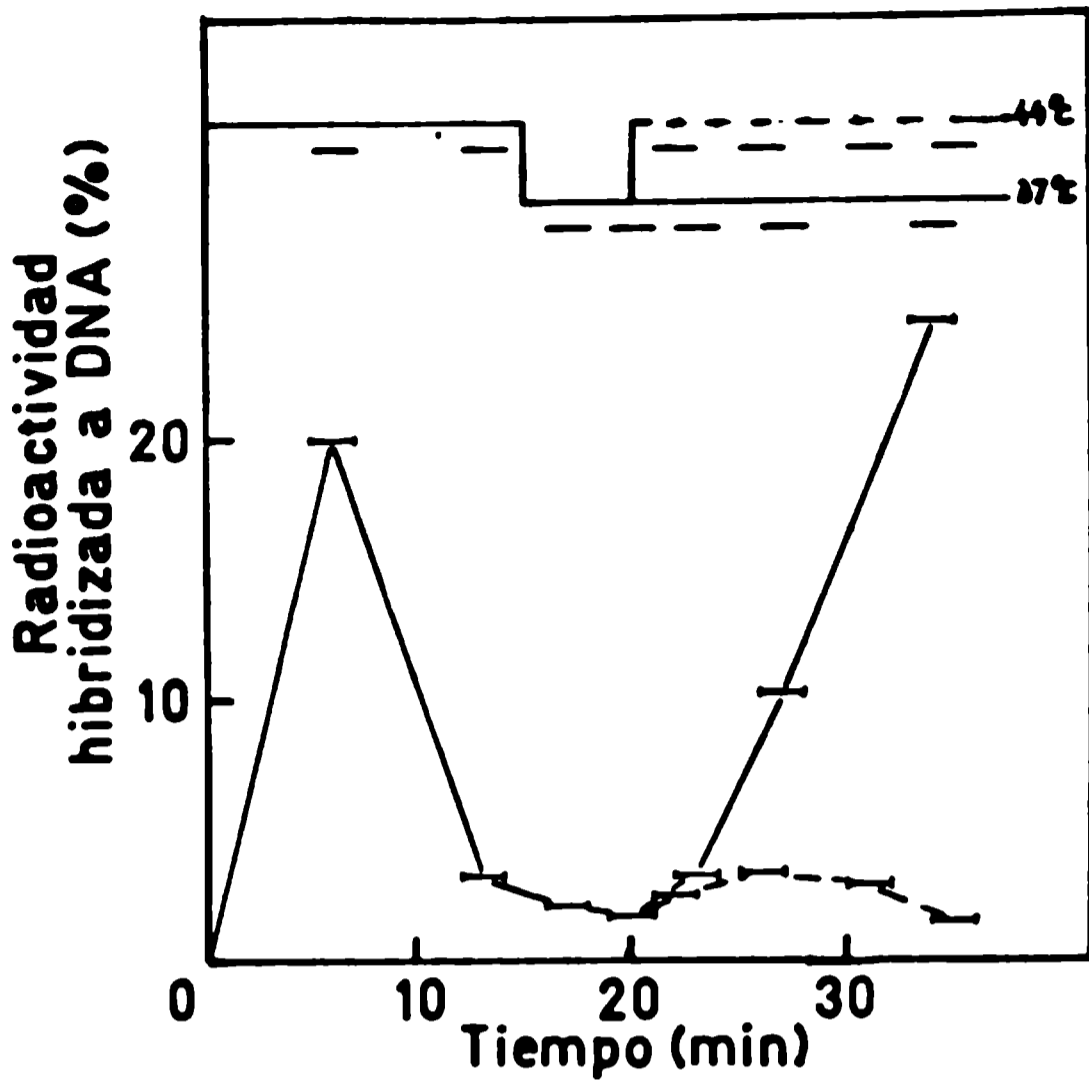


Figura 13. Nivel de transcripción viral en B. subtilis 168M infectado con ts-14-1 a 44° C y sometido a transiciones térmicas.

A los 15 minutos post-infección se transfirió el cultivo a 37° C. Una fracción permaneció a esta temperatura (—) y otra fue transferida a 44° C a los 20 minutos post-infección (- - -). A distintos tiempos se marcó RNA durante pulsos de dos minutos (indicados por barras horizontales cortas en el esquema experimental) con <sup>3</sup>H-Uracilo (22 µCi/ml y 0.20 µg/ml). El porcentaje de bacterias no infectadas fue 0.7.

Los RNAs fueron aislados e hibridizados a DNA de SPO 1, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

<sup>3</sup> H-RNA Período de marcación (min)	Blanco en ausencia de DNA (cpm)	Radioactividad to- tal agregada (cpm)
5-7	33	6356
12-14	49	19669
16-18	45	11458
19-21	43	10058
21-23	42	6913
22-24	59	5706
25-27	18	4889
26-28	58	5193
30-32	29	6263
33-35	52	3093
34-36	66	4434

codificado por el bacteriofago implica la transcripción de todos los mensajes esenciales en cantidad suficiente como para producir proge-  
nie, puesto que en estas condiciones se obtiene alrededor de 10 % de los bacteriofagos que se producen cuando no se reeleva la temperatura (Ver Figura 9, línea 5).

La reinhibición de la síntesis de RNA viral se produce luego de 7 minutos de haber elevado la temperatura del cultivo. Por lo tanto, existe un retardo en la respuesta de la transcripción a la reactivación y a la inactivación de gp31, del orden de 7 minutos en ambos casos, Estos retardos podrían ser consecuencia de:

- que el efecto de gp31 sobre la transcripción no sea directo;
- que el sistema (bacteria infectada) necesite un cierto tiempo para adaptarse a la nueva situación, creada por la transición térmica;
- que la transcripción, muy escasa al momento de bajar la temperatura, se recupere a través de la resíntesis (en pequeña proporción) de las clases de RNAs tempranas, que ya habían sido transcriptas durante los primeros 15 minutos, a 44° C, y no a través de la continuación del programa de transcripción desde el punto en que se hallaba al bajar la temperatura. Esto explicaría sólo el retraso observado en la recuperación del nivel de transcripción, no el que se aprecia en la reinhibición posterior.

Con respecto a que la bacteria infectada necesite cierto período de adaptación a la nueva temperatura de incubación, no hay indicios de tal necesidad, pero no se descarta. Un cultivo sometido a transiciones térmicas continúa creciendo sin aparentes modificaciones en el tiempo de duplicación (no se muestran los datos) e incorpora <sup>3</sup>H-Adenina en RNA con velocidades que si bien son diferentes a 37 y 44° C, no indican una paralización de la transcripción ante el cambio brusco de temperatura (Ver Figura 12).

La posibilidad de resíntesis de mRNAs "tempranas" (aunque sólo sea en pequeña proporción) podría verificarse por hibridización competitiva. Se realizaron una serie de experimentos de ese tipo, con los <sup>3</sup>H-RNAs marcados por pulsos a lo largo del experimento

esquemático en la Figura 13, utilizando competidores ricos en clases tempranas y en clases intermedias y tardías. Los resultados mostraron una gran variación, probablemente a causa de las limitaciones de la técnica usada y de los bajos niveles de hibridación de los <sup>3</sup>H-RNAs analizados.

Aún dentro de las limitaciones apuntadas, los resultados no sugirieron un incremento en la proporción de mRNAs "tempranos" luego del descenso de la temperatura.

D. Influencia del gen 31 sobre la transcripción en ausencia de replicación.

Si el efecto de la función del gen 31 sobre la síntesis de RNA no fuera directo, podría estar mediado por la síntesis de DNA. Es decir, podría ser necesario un DNA recientemente replicado para poder transcribir los RNAs que se producen luego del descenso de la temperatura, 15 minutos después de la infección. Al reelevarse la temperatura, la inhibición de la transcripción requeriría la previa paralización de la replicación.

En otras palabras, la acción de gp31 sobre la transcripción podría ser secundaria a (o consecuencia de) su acción sobre la replicación. Esto puede probarse, en principio, de dos maneras. Una consiste en agregar un inhibidor de la síntesis de DNA en el momento de bajar la temperatura a 37° C y verificar si se mantiene el aumento de la transcripción viral observado sin inhibidor.

Otra forma consistiría en agregar al genoma de ts-14-1 una segunda mutación que impida la síntesis de DNA en condiciones permisivas para la mutación original de ts-14-1. Es decir, utilizar un mutante doble que contenga la mutación ts-14-1 y otra no sensible a la temperatura en un cistrón, distinto del 31, cuyo producto se requiera para la replicación del genoma de SPO 1. Esta segunda mutación debe producir, cuando se encuentra sola, un fenotipo defectivo en replicación (DO), pero con un nivel de transcripción viral relativamente alto, aún después de los 15 minutos post-infección. Por otra



parte, esta mutación podría ser de tipo supresible, puesto que la cepa 168 M de *B. subtilis* es no supresora.

Se eligió el mutante sus-F-30 para cruzarlo con ts-14-1, por haber sido caracterizado como DO (Gage & Geiduschek, 1971 b) y con un nivel de transcripción del orden de 10 % hasta 25 minutos después de la infección, a 37° C (Fujita & col., 1971).

Sin embargo, cuando se infectó *B. subtilis* 168 M con sus-F-30 a 44° C y 15 minutos después se bajó la temperatura a 37° C, el nivel de transcripción, luego de los 15 minutos, no fue suficientemente alto para nuestros propósitos (Figura 14 A). Efectivamente, la fracción de RNA hibridizable a DNA de SPO 1 fue del orden de 25 % entre 5 y 7 minutos, 17 % entre 12 y 14 minutos, 9 % entre 17 y 19 minutos y osciló entre 3 y 5 % desde los 22 hasta los 35 minutos. Dado que la reactivación de gp31, en ts-14-1, conduce a un aumento en el nivel de transcripción que se aprecia a partir de los 20-22 minutos, en el doble mutante sus-F-30/ts-14-1 el eventual incremento ante la reactivación de gp31 estaría limitado por el efecto de la mutación en el gen 22. Efectivamente, sus-F-30/ts-14-1 no muestra recuperación en el nivel de transcripción luego de la transición térmica practicada a los 15 minutos (Figura 14 B). Este comportamiento no puede atribuirse a que gp31 actúe sobre la transcripción a través de un eventual efecto sobre la replicación, a causa del bajo nivel de transcripción de sus-F-30 en las mismas condiciones.

Sin embargo, la curva de hibridización para el doble mutante es muy similar a la de ts-14-1 y diferente de la de sus-F-30, durante los primeros 15 minutos a 44° C (Figura 14). Este resultado indica que cuando la replicación está bloqueada por inactividad de gp31 la transcripción del genoma es menor que cuando la replicación está impedida por carencia de gp22. Por otra parte, la carencia de gp22 no atempera el efecto de la mutación ts-14-1.

Ante esta situación no resuelta por medio del doble mutante,

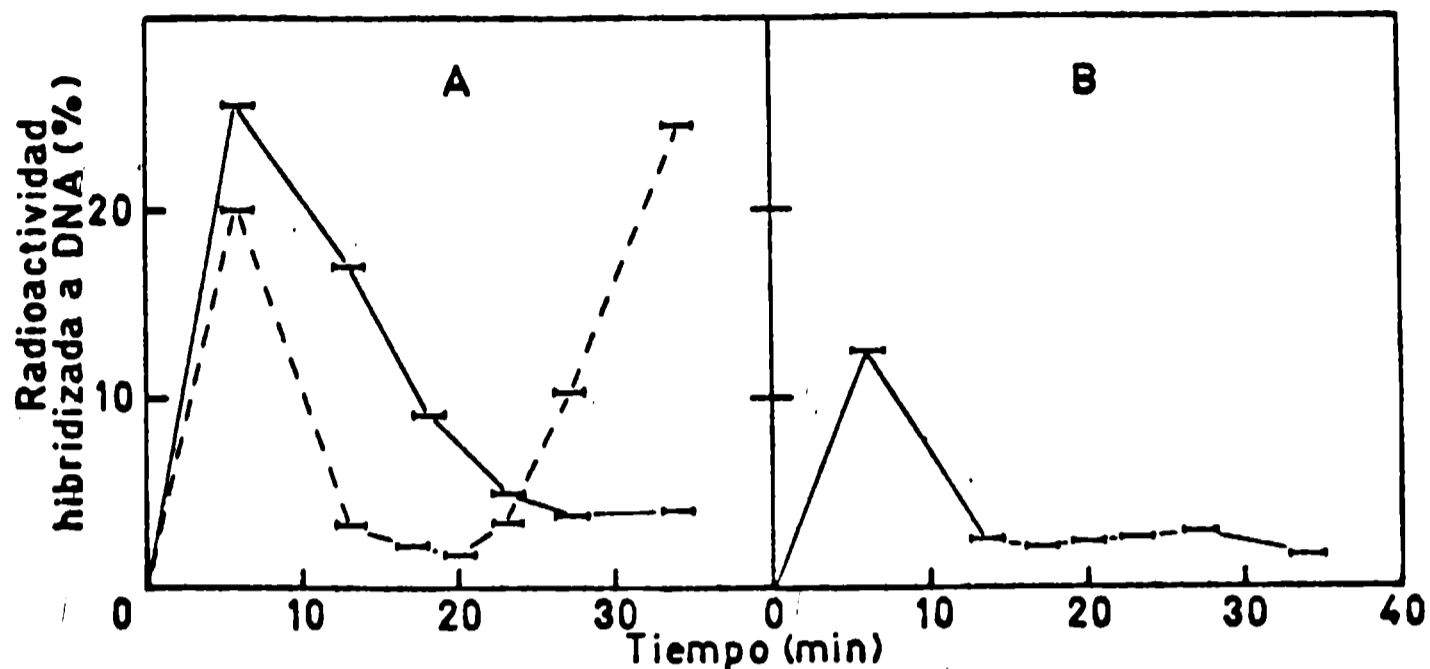


Figura 14. Nivel de transcripción viral en *B. subtilis* 168 M infectado con sus-F-30 o con sus-F-30/ts-14-1 a 44°C y transferido a 37°C a los 15 minutos.

La infección se realizó con sus-F-30 (parte A; —) y con sus-F-30/ts-14-1 (parte B). A distintos tiempos se marcó RNA durante pulsos de 2 minutos con <sup>3</sup>H-Uridina (20 µCi/ml y 0.20 µg/ml). El porcentaje de bacterias no infectadas fue 1 (parte A) y 1.1 (parte B). Los RNAs fueron aislados e hibridizados a DNA de SPO 1 según lo descrito en Materiales y Métodos.

En la parte A se ha agregado, para comparación, la curva correspondiente a ts-14-1 (- - -), tal como se la presenta en la Figura 13.

<sup>3</sup> H-RNA Período de marcación (min)	Blanco en ausencia de DNA (cpm)		Radioactividad total agregada (cpm)	
	sus-F-30	sus-F-30/ /ts-14-1	sus-F-30	sus-F-30/ /ts-14-1
5-7	13	21	1740	2034
12-14	13	9	3049	7815
16-18		18		3813
17-19	7		2151	
19-21		15		3017
22-24	24	8	1462	3259
26-28	14	11	1302	2861
33-35	12	28	1246	4509

se optó por emplear un inhibidor de la síntesis de DNA.

El inhibidor a usar no debe anular la síntesis de RNA, lo cual constituye una limitación. Por otra parte, no se han descrito inhibidores específicos para la actividad DNA polimerasa-DNA dependiente de SPO 1 (Yehle & Ganesan, 1973). A su vez, los análogos Arabinosil-Adenina y Arabinosil-Citosina no penetran en *B. subtilis*, a menos que se permeabilicen previamente las células (Rashbaum & Cozzarelli, 1976).

Por estas causas, se apeló al uso del ácido nalidíxico (NAL) (Cook & col., 1966; Crumplin & Smith, 1976). En bajas concentraciones, NAL inhibe completamente la replicación en *B. subtilis*, sin afectar la de SPO 1 (Gage & Fujita, 1969). Sin embargo, si se incrementa suficientemente la concentración de NAL se puede alcanzar una muy buena inhibición de la síntesis de DNA, en bacterias infectadas con ts-14-1 a 37° C (Tabla 1).

Cuando se probó el efecto de agregar NAL a un cultivo de *B. subtilis* 168 M infectado con ts-14-1, al mismo tiempo de bajar la temperatura, desde 44 a 37° C, se obtuvo también una muy buena inhibición de la replicación (Figura 15 A). En cambio, el efecto sobre la transcripción fue relativamente bajo (Figura 15 B); la incorporación de <sup>3</sup>H-Adenina en RNA cuando se agregó NAL al bajar la temperatura representa un 65 % de la incorporación cuando no se agregó antibiótico al efectuar la transición térmica. Al reelevar la temperatura a los 30 minutos, se obtuvo un aumento en la síntesis de RNA total, que puede deberse a la mayor transcripción observada en bacterias infectadas a 44° C respecto a 37° C (Figura 12).

Por lo tanto, puede usarse ácido nalidíxico para inhibir la replicación al tiempo que se reactiva a gp31, manteniendo una incorporación de precursor en RNA total que permite estudiar el nivel de transcripción viral en tales condiciones.

Para eso, se prepararon <sup>3</sup>H-RNAs marcados por pulsos durante un experimento iniciado con infección a 44° C, seguido de transferencia a 37° C a los 15 minutos con o sin agregado de NAL. Los

TABLA 1

INHIBICION DE LA SINTESIS DE DNA POR ACIDO NALIDIXICO EN  
B. SUBTILIS 168 M INFECTADO CON ts-14-1 A 37° C.

NAL (µg/ml)	Radioactividad incorporada en DNA (cpm)	Inhibición (%)
0	4140	0
120	1021	75
240	500	88
360	200	95
5*		0
25*		30
50*		60

A los 5 minutos post-infección se agregó <sup>3</sup>H-Adenina (5µCi/ml y 17 µg/ml). A los 11 minutos se agregó NAL, hasta las concentraciones que se indican, a tres fracciones del cultivo; una cuarta fracción permaneció sin NAL. A los 42 minutos se tomaron muestras de 0.5 ml en las que se determinó la incorporación de <sup>3</sup>H-Adenina en material estable al álcali y precipitable por ácido, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. El porcentaje de bacterias no infectadas fue 1.

Se incluyen como comparación (\*) resultados obtenidos por Gage y Fujita (1969), con SPO 1 silvestre.

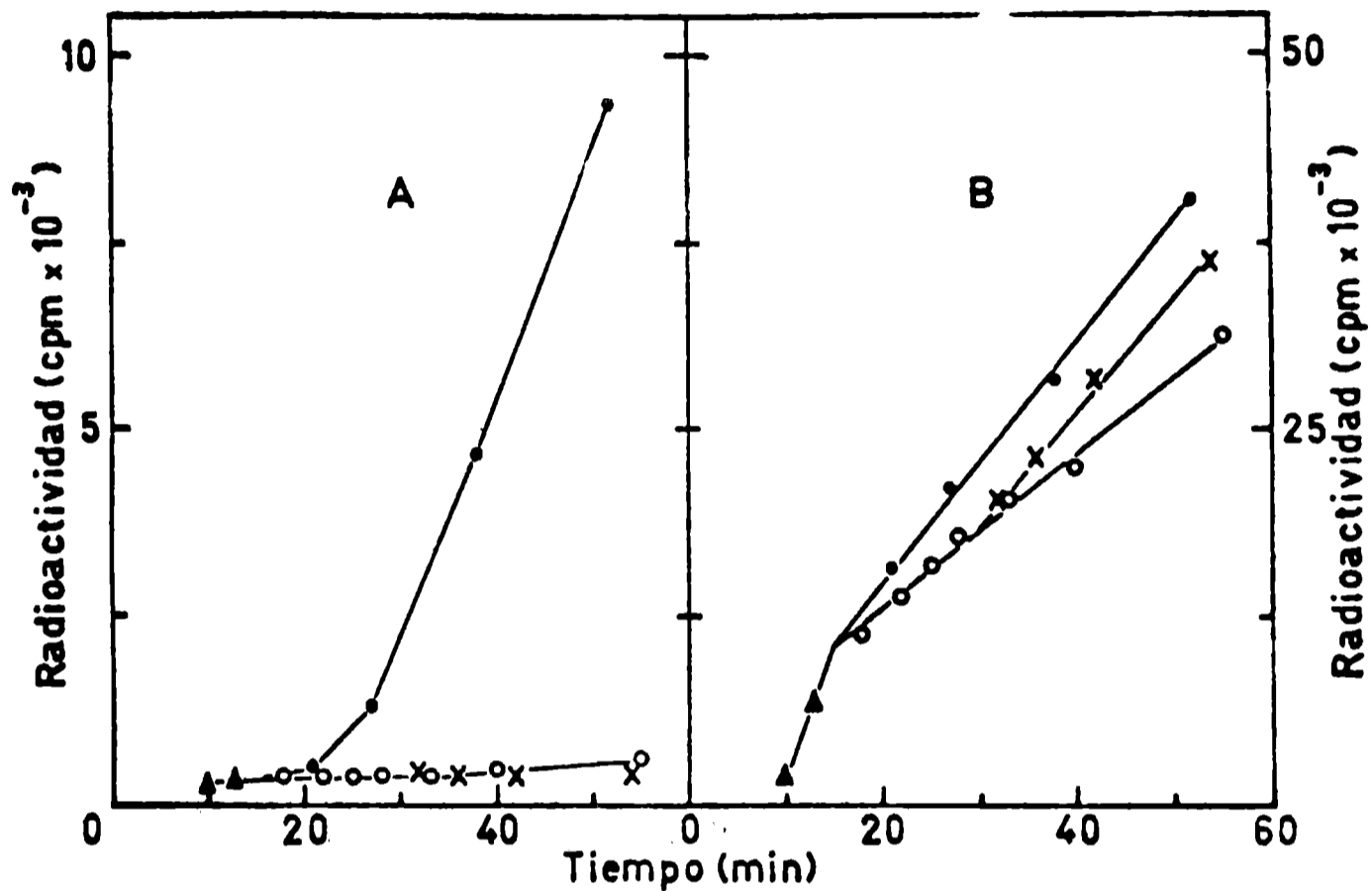


Figura 15. Incorporación de  $^3\text{H}$ -Adenina en DNA y RNA por *B. subtilis* 168 M infectado con ts-14-1 a  $44^\circ\text{C}$  y sometido a transiciones térmicas en presencia de ácido nalidíxico.

Se agregó  $^3\text{H}$ -Adenina ( $5\ \mu\text{Ci/ml}$  y  $17\ \mu\text{g/ml}$ ) a los 8 minutos después de la infección a  $44^\circ\text{C}$  ( $\blacktriangle$ ). A los 15 minutos, una fracción del cultivo se transfirió a  $37^\circ\text{C}$  ( $\bullet$ ) y otra a  $37^\circ\text{C}$  agregándose simultáneamente NAL hasta  $360\ \mu\text{g/ml}$ . De esta última, una parte permaneció a  $37^\circ\text{C}$  ( $\circ$ ) y otra se retransfirió a  $44^\circ\text{C}$  a los 30 minutos ( $\times$ ). De cada uno de los tres subcultivos se tomaron muestras de 0.5 ml que fueron procesadas para la determinación de radioactividad incorporada en material estable al álcali (DNA, parte A) e inestable al álcali (RNA, parte B) y precipitable por TCA, como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de bacterias no infectadas fue 0.4.

<sup>3</sup>H-RNAs fueron hibridizados a DNA de SPO 1 y las curvas de nivel de transcripción obtenidas se muestran en la Figura 16.

Hasta el momento de la transición térmica se obtuvieron niveles dentro de los habituales: 17-18 % de hibridización para el <sup>3</sup>H-RNA marcado entre los 5 y 7 minutos, 5-6 % para el marcado entre los 11 y 13 minutos. El descenso de la temperatura a los 15 minutos, en presencia de NAL, no va acompañado de una recuperación en el nivel de transcripción viral, que se mantiene muy bajo, entre 3 y 4 %, hasta más allá de los 40 minutos. En las mismas condiciones, pero en ausencia de NAL, la síntesis de mRNAs virales comienza a aumentar hacia el 22º minuto y alrededor de los 32 minutos alcanza el nivel correspondiente al RNA marcado entre los 5 y 7 minutos (16 % de hibridización para el RNA marcado entre los 31 y 33 minutos). Luego, el nivel de transcripción, en ausencia de NAL, se estabiliza, ya que el RNA marcado entre los 39 y 41 minutos hibridiza un 18 %, aproximadamente, a DNA de SPO 1. Por otra parte, la curva de nivel de hibridización de los RNAs marcados en ausencia de NAL, está dentro de lo que se espera en estas condiciones, teniendo en cuenta las variaciones propias de estos experimentos (preparación de los RNAs e hibridización de los mismos a DNA; compárese con los resultados obtenidos de una preparación e hibridización independientes, mostrados en la Figura 13).

Si consideramos que, en ausencia de NAL, el nivel de transcripción aumenta desde un 3 % (entre los 15 y los 20 minutos post-infección) hasta un 18 % a los 40 minutos, mientras que en presencia de NAL el incremento sería desde un 3 a un 4 % (diferencia que en sí misma no es significativa), se puede estimar que la inhibición de la replicación anula en alrededor de 95 % la transcripción viral, en condiciones en que gp31 está activo. Esta inhibición es del mismo orden de la obtenida para la síntesis de DNA con la misma concentración de NAL (Figura 15 A) y mucho mayor que la producida por el NAL sobre la síntesis de RNA total, que es del orden de 35 % (Figura 15 B). Por otra parte, un efecto tóxico generalizado del NAL no

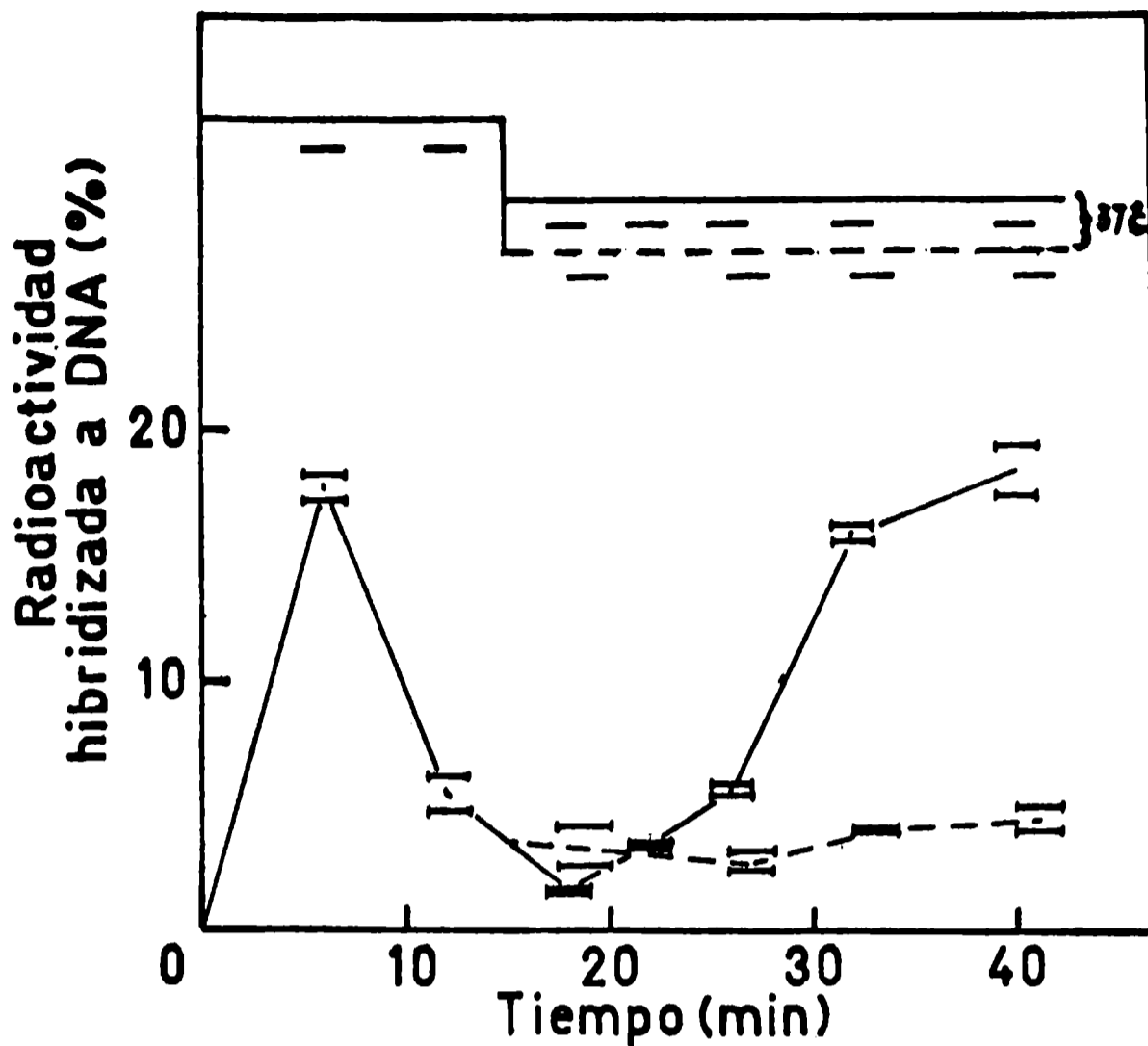


Figura 16. Nivel de transcripción viral en B. subtilis 168 M infectado con ts-14-1 a 44° C y transferido a 37° C en presencia de ácido nalidíxico.

A los 15 minutos post-infección se transfirió una parte del cultivo a 37° C (—) y otra a 37° C agregándose simultáneamente NAL hasta 360 µg/ml (- - -). A distintos tiempos se marcó RNA durante pulsos de dos minutos (indicados por barras horizontales cortas en el esquema experimental) con <sup>3</sup>H-Uridina (20 µCi/ml y 0.20 µg/ml). El porcentaje de bacterias no infectadas fue 0.9.

Los RNAs fueron aislados e hibridizados a DNA de SPO 1 según se indica en Materiales y Métodos.

<sup>3</sup> H-RNA Período de marcación (min)	Blanco en ausencia de DNA (cpm)	Radioactividad to- tal agregada (cpm)
5-7	5	1101
11-13	8	5864
17-19	9	6974
18-20	23	5175
21-23	10	4375
25-27	24	3786
26-28	8	3847
31-33	14	1232
32-34	27	8341
39-41	12	742
40-42	75	6674

necesariamente alteraría el nivel de transcripción viral.

Resulta pues claro que la reactivación térmica de gp31 no es suficiente para la recuperación de la síntesis de mRNAs virales. Para esa recuperación es necesaria, además, la replicación del genoma del bacteriofago.

#### E. Análisis de los resultados.

El fenotipo del mutante ts-14-1 ha permitido estudiar el efecto que ejerce la actividad de gp31 sobre la replicación y transcripción del genoma viral. Así, fue posible mantener las bacterias infectadas con ts-14-1 a 44° C hasta los 15 minutos, arribándose a una situación en la cual la transcripción viral es muy baja, la replicación no ha comenzado y gp31 está presente, pero inactivo. Si en ese momento se baja la temperatura, gp31 se reactiva (por otra parte su síntesis podría continuar) y el desarrollo de ts-14-1 prosigue hasta la lisis.

En estas condiciones, la iniciación de la replicación y la recuperación del nivel de transcripción se produjeron al mismo tiempo. La reinactivación posterior de gp31 detuvo la síntesis de DNA y redujo la transcripción viral hasta los niveles pre-recuperación; los resultados disponibles indicaron, también aquí, la simultaneidad de ambos efectos (Figuras 10, 12 y 13).

De este modo, no pudo establecerse una relación de causalidad entre los dos efectos a partir de consideraciones temporales. Esa eventual relación constituye un dato importante para conocer sobre qué faceta del desarrollo del bacteriofago actúa gp31.

Se plantearon tres posibilidades para el modo de acción de gp31 sobre la transcripción y la replicación (Figura 17). Dos de ellas consisten en un efecto primario de gp31 sobre uno de los procesos, mientras el efecto sobre el otro proceso sería consecuencia del primero. La tercera posibilidad está dada por acciones independientes sobre ambas síntesis.

La inhibición de uno de los procesos en condiciones que



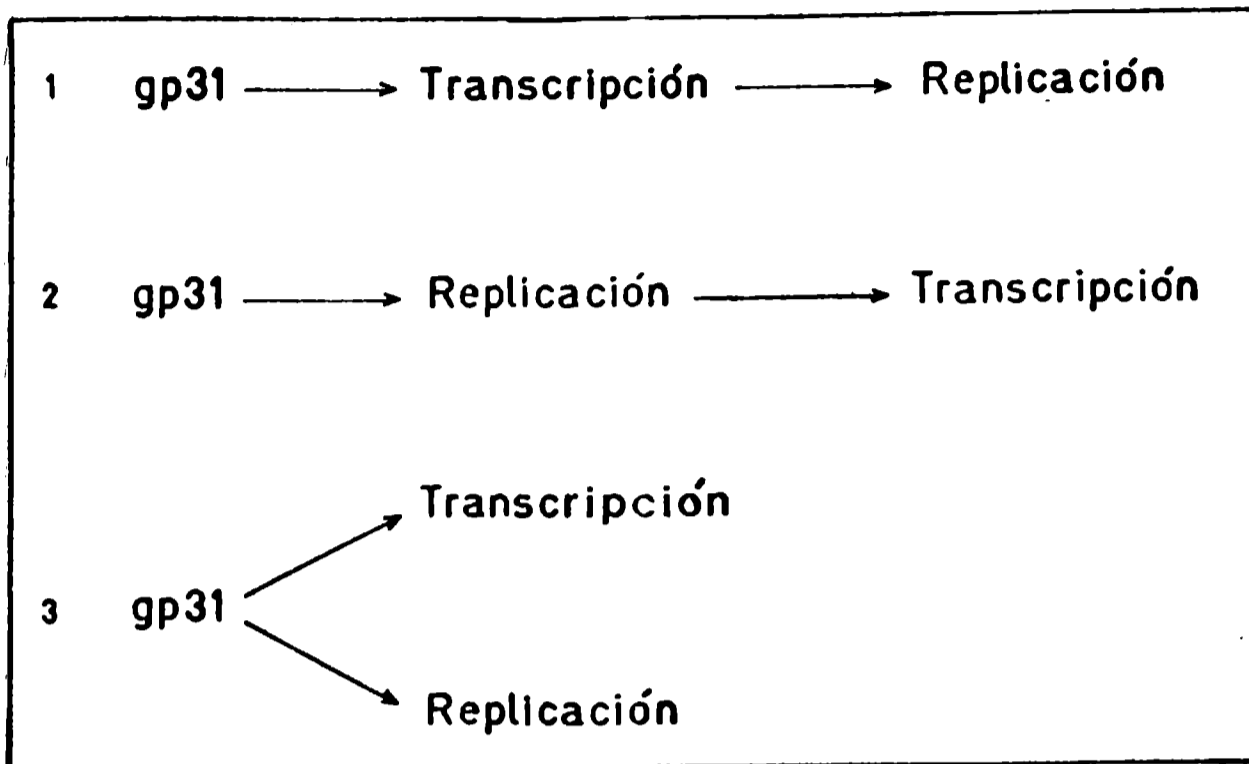


Figura 17. Posibles modos de acción de gp31 sobre la replicación y la transcripción.

no comprometieran al otro (o lo hicieran levemente), ha permitido descartar la primera posibilidad (Figura 11) y aceptar la segunda (Figura 16). A su vez, la tercera puede descartarse desde el momento que se acepta una de las anteriores.

Es decir, gp31 desarrolla una acción sobre la síntesis de DNA que no está mediada por su efecto sobre la síntesis de RNA; en cambio, gp31 actúa sobre la transcripción a través de su efecto en replicación.

De este modo, gp31 estaría implicado en el proceso de replicación del genoma de SPO 1. La reactivación térmica de gp31 permitiría la iniciación de la síntesis de DNA y la disponibilidad de un modelo recientemente sintetizado podría ser la causa del aumento observado en el nivel de transcripción viral. Al inactivar a gp31, su capacidad de acción sobre la replicación se iría agotando hasta anularse y, paralelamente, disminuiría la capacidad del sistema para transcribir el genoma del bacteriofago (posiblemente por incompetencia del modelo).

DISCUSSION

## I. FENOTIPO DE ts-14-1 A 37° C.

Los parámetros temporales del ciclo lítico del mutante ts-14-1 a 37° C son distintos de los correspondientes al tipo silvestre de SPO 1. Así, la iniciación de la síntesis de DNA, la curva de nivel de transcripción viral, la producción de bacteriofagos intracelulares y la lisis de la bacteria infectada presentan retardos del orden de 10 minutos.

De este modo, si bien aquí se ha considerado a 37° C como temperatura permisiva, los resultados presentados en las Figuras 2, 3 y 4 indican que 37° C es una temperatura semi-permisiva para el desarrollo de ts-14-1 en B. subtilis 168 M.

No parece haber un retraso en los primeros 8 minutos post-infección, tal como puede juzgarse a través de la curva de nivel de transcripción (Figura 4). De ahí en más, el retardo se hace evidente en la iniciación de la replicación (Figura 3) y en el estiramiento de la zona del valle de la curva de nivel de transcripción. Estos hechos se reflejan posteriormente en el tiempo necesario para producir el equivalente de un bacteriofago por bacteria infectada y la lisis bacteriana (Figura 2).

La comparación de las pendientes de las curvas de producción de bacteriofagos y síntesis de DNA para ts-14-1 y SPO 1 silvestre sugiere que los dos procesos transcurren con velocidades similares, una vez puestos en marcha (Figuras 2 y 3).

El fenotipo de ts-14-1 a 37° C puede considerarse como causado por un defecto en la capacidad para iniciar la replicación en el tiempo normal. Sin embargo, puede también suponerse que ts-14-1 transcribe lentamente un mRNA o una clase de mRNAs cuyos productos son esenciales para la síntesis de DNA. Por otra parte, puede argumentarse a favor de una deficiencia en una función no impli- cada directamente en la replicación o transcripción virales, sino, por ejemplo, en la modificación o represión de una actividad de la

bacteria. En el apartado I D de RESULTADOS se ha optado por la primera de las interpretaciones aquí señaladas. Los resultados posteriores (Figuras 11 y 16) apoyan ese punto de vista.

Se conocen otros mutantes de SPO 1 en los que la síntesis de DNA se inicia más tarde que en el silvestre (Fujita, 1971; Okubo & col., 1972). En ellos este fenotipo, DD, se observa durante la infección en condiciones en que no se produce progenie. En cambio, ts-14-1 presenta fenotipo DD en condiciones en que el ciclo culmina con la lisis de la bacteria y la producción de una cantidad relativamente grande de bacteriofagos (alrededor de 30 por bacteria infectada). Este hecho es novedoso en este sistema y no sabemos que se lo haya observado en otros bacteriofagos.

Este fenotipo DD tiene como atractivo la posibilidad de brindar, en principio, mayor comodidad para el estudio de los controles de las etapas intermedias del desarrollo de SPO 1. Como vimos en la Figura 1, entre los 8 y 12 minutos post-infección se concentran varios eventos importantes, relacionados con la replicación y transcripción. El estiramiento de esta parte del ciclo lítico facilitaría su estudio, suponiendo que si ts-14-1 emplea más tiempo que el silvestre para efectuar los mismos procesos, será mayor la probabilidad de analizar uno de ellos sin demasiada influencia de los otros y de establecer interrelaciones más claras que las actualmente conocidas. Esta supuesta potencialidad del fenotipo DD ha sido parcialmente explotada durante el presente trabajo.

Una característica interesante del desarrollo de SPO 1 en *B. subtilis* 168 M a 37° C, es la dependencia que presenta la capacidad productora de bacteriofagos respecto de la síntesis de proteínas (Figuras 5 y 6). Esta dependencia es estricta durante todo el ciclo lítico (dentro de los límites de resolución de la metodología utilizada) y ha sido observada también con el mutante sus/ts-0-36 en la cepa HA 101 B (Añón, 1974). Este comportamiento difiere del descrito durante la infección de *E. coli* por T 4

(Pulitzer, 1970); en este caso, la adición de inhibidores de la traducción al medio de cultivo no impide la producción de bacteriofagos por encima de los presentes al tiempo de tales agregados.

Parece claro que la completa formación de una partícula viral infectante de SPO 1 requiere la síntesis continua de una o más proteínas.

## II. NATURALEZA Y TIEMPOS DE ACCION Y SINTESIS DE gp31.

Los experimentos de transiciones térmicas y entre medios con y sin inhibidores, permitieron establecer que gp31 comienza a sintetizarse antes de los 15 minutos a 44° C y que su acción se inicia antes de los 20 minutos (a 37° C, o 5 minutos a 37° C luego de 15 a 44° C) (Figuras 6 y 9).

Si bien el ciclo lítico de SPO 1 a 44° C no ha sido estudiado con el mismo detalle que a 37° C, no hay indicios de diferencias en los tiempos que lo caracterizan ni en el orden de los diferentes eventos (Gage & Geiduschek, 1971 a; Wilson & Gage, 1971; Añón, 1974).

Suponiendo que la escala de tiempos es la misma a 37 y 44° C, la síntesis de gp31 comienza en etapas tempranas (Pre-replicativas) del ciclo lítico. Así, en ts-14-1, el mRNA correspondiente a gp31 ha sido sintetizado, en cantidad suficiente para cumplir su función en la síntesis de DNA, antes de los 15 minutos (Figura 11). Lo mismo se aplica a los mRNAs correspondientes a todas las funciones requeridas para la síntesis de DNA, pues ésta se inicia y transcurre del mismo modo en presencia y en ausencia de rifampicina (Figuras 10 y 11). Esto indica que gp31 (inactivo a 44° C) no afecta la transcripción de los demás mensajes necesarios para la replicación.

A su vez, en el tipo silvestre, la replicación se hace insensible a la rifampicina a los 8 minutos post-infección (Gage & Geiduschek, 1971 b). Este es el tiempo hasta el cual parece ser normal el desarrollo de ts-14-1. Este hecho apoya también la idea de que la inactividad de gp31 en ts-14-1 afecta a la replicación antes que a la transcripción.

Existe un lapso relativamente largo entre la iniciación de la síntesis de gp31 (antes de los 15 minutos) y la acumulación de un efecto suficiente para iniciar la replicación y para producir progenie (20 minutos; Figuras 3, 6 y 10). Si bien no contamos

con elementos suficientes para especular acerca de este tiempo, puede pensarse que sea necesario un nivel relativamente alto de gp31 activo (nivel que no se alcanza inmediatamente), que gp31 sufre un procesamiento post-síntesis (que insumiría un cierto tiempo), que gp31 tiene una actividad biológica disminuida en ts-14-1 a 37° C o algún otro mecanismo más complejo y/o indirecto (tal como una combinación entre los aquí mencionados).

A lo largo de este trabajo hemos supuesto que gp31 es una proteína (o polipéptido). Un hecho experimental que apoya esta presunción es el mostrado en la Figura 9 (líneas 4, 5 y 6). Se puede considerar el diseño de la línea 6 como una combinación de las líneas 4 y 5. Si el producto termosensible fuera una proteína, el efecto del cloranfenicol sobre la síntesis y el de la temperatura, sobre el producto, podrían ser aditivos. Los resultados de la línea 6 muestran tal aditividad, dentro de los márgenes de variación relativamente amplios que son propios de estos experimentos. Así, el rendimiento de 3.7 % es comparable al producto 23 % x 18 % (4.1 % final) y aún 2.4 % no es muy diferente de 30 % x 17 % (5.1 % final).

Sin embargo, es posible que gp31 no sea una proteína. Si fuera, por ejemplo, un RNA, se trataría también de un RNA sensible a la temperatura, cuya síntesis no es termosensible (Figura 11).

Aún cuando no hemos demostrado la verdadera naturaleza de gp31, creemos que la más probable es la polipeptídica y como tal ha sido considerada.

Otros aspectos de la acción de gp31 que merecen destacarse derivan de los experimentos de las Figuras 6 y 8.

gp31 muestra un efecto de "disparo" sobre el desarrollo del bacteriofago, puesto que desde los 20 minutos se puede prescindir de él sin comprometer la producción de algunos bacteriofagos (Figura 6). Pero la prescindibilidad es parcial, aún bastante más



allá de los 20 minutos. De manera que posiblemente gp31 actúe sobre un proceso con efecto/s multiplicador/es, pero que debe continuar hasta muy avanzado el ciclo lítico.

A su vez, la bacteria infectada puede esperar la disponibilidad de un gp31 activo hasta los 15 minutos post-infección, pero no más (Figura 8). En este aspecto, el caso de gp31 es distinto al de gp28, que puede permanecer inactivo hasta 90 minutos sin afectar la capacidad de producir progenie al reactivarlo (Añón, 1974).

gp28 modifica la especificidad de la RNA polimerasa bacteriana, posibilitando la síntesis de mRNAs intermedios; su acción se inicia alrededor de los 4 minutos y es imprescindible hasta la lisis.

La diferencia mencionada entre gp28 y gp31 probablemente refleje la trascendencia que tendría la modificación del aparato de transcripción celular para el desarrollo del bacteriofago. Se puede pensar que en tanto gp28 no haya permitido la transcripción de los mensajes intermedios, el sistema permanece en un estado susceptible a la acción de gp28, aún por mucho tiempo (90 minutos). Ese estado implica la preservación del genoma viral, el cual es capaz de expresarse ante la reactivación de gp28, completando el ciclo lítico.

El mantenimiento del genoma infectante en un estado "latente" se ha observado también en la infección de *B. subtilis* esporulante con el bacteriofago  $\phi$  E. El DNA de  $\phi$  E puede incorporarse a los esporos y expresarse después de la germinación (Sonenshein & Roscoe, 1969). La RNA polimerasa extraída de células vegetativas transcribe "in vitro" el DNA de  $\phi$  E, mientras que la obtenida de células esporulantes es incapaz de hacerlo (Losick & Sonenshein, 1969).

Si bien se trata de bacteriofagos distintos, aunque relacionados química y serológicamente (Aposhian, 1965; Brodetsky & Romig, 1965), los resultados sugieren que el DNA infectante puede

mantenerse en un estado de latencia, mientras no es transcripto (caso de  $\phi$  E en bacterias esporulantes) o mientras sólo se transcriban los genes tempranos (caso de mutantes de SPO 1 defectivos en gp28).

En el caso de SPO 1, parecería que una vez iniciada la transcripción de los mensajes intermedios, dependiente de gp28, los sucesos siguientes deben acaecer dentro de márgenes temporales relativamente estrechos. Si un producto no se hallara disponible al tiempo en que debe actuar, la infección se volvería abortiva. Así ocurriría con gp31, un producto que se supone es codificado por mensajes intermedios y actúa en conjunción con otros productos de tales clases (Gage & Geiduschek, 1971 b; Yehle & Ganesan, 1973; Añón, 1974; Shub, 1975; Shub & Johnson, 1975).

### III. EFFECTOS DE gp31 SOBRE LA REPLICACION Y LA TRANSCRIPCION.

Una consecuencia de los experimentos de la Figura 9 consiste en la posibilidad de conceder al sistema ciertos lapsos "per<sup>u</sup>misivos", suficientes para producir progenie y, en estas condiciones, estudiar cómo influye la actividad de gp31 sobre procesos supuestamente dependientes de él, de acuerdo al fenotipo de ts-14-1 a 44° C.

La reactivación de gp31 permite la iniciación de la replicación y el incremento del nivel de transcripción. Estos dos efectos son aproximadamente simultáneos y tienen lugar luego de varios minutos desde la reactivación de gp31. A su vez, la inactivación posterior de gp31 provoca la inhibición de la replicación y de la síntesis de RNA; ambas inhibiciones ocurren luego de un cierto tiempo y más o menos simultáneamente. Esta situación ya ha sido analizada y no permitió establecer cual de los dos efectos de gp31 es primario (al menos respecto al otro). La inhibición de la replicación o la transcripción en condiciones en que la otra no está inhibida y gp31 está activo, permitió establecer que la actividad de gp31 está dirigida a la síntesis de DNA (Figuras 11, 16 y 17).

Una pregunta que surge de lo expuesto es qué función puede cumplir gp31 en la replicación del DNA de SPO 1. Se puede intentar una aproximación a la respuesta. Para ello apelaremos a los datos disponibles sobre el proceso de replicación en SPO 1 y a lo que se conoce sobre él en el bacteriofago T 4.

En el caso de T 4, se puede obtener síntesis de DNA "in vitro", incubando los productos purificados de los genes 32, 41, 43, 44, 45 y 62, deoxirribonucleósidos-trifosfato y ribonucleósidos-trifosfato, con modelos de simple y doble cadena. Esta síntesis "in vitro" es una aceptable reproducción del proceso "in vivo" (Morris & col., 1975).

De los seis productos virales mencionados, gp43 es una

DNA polimerasa, de P. M. 110000 Daltons (Nossal & Hershfield, 1971), la cual posee también actividad de exonucleasa (Brutlag & Kornberg, 1972).

gp32 es una proteína con actividad desestabilizante de la estructura del DNA, causando, aparentemente, una apertura del modelo, necesaria para su replicación. gp32 estimula la actividad de gp43, cuando el modelo es DNA de cadena simple (Huberman & col., 1971) y resulta esencial cuando el modelo es de doble cadena (Nossal, 1974).

Los productos de los genes 44 y 62 han sido aislados en forma de un complejo cuya función no se conoce exactamente, aunque exhibe dos actividades que dependen o son estimuladas por la presencia de gp45 y rATP: hidrólisis de ATP a ADP y Pi (dependiente de DNA) y aumento de la velocidad de la reacción de polimerización catalizada por gp43 (Alberts & col., 1975), la cual alcanza así valores comparables a los observados "in vivo".

La única actividad conocida de gp45 es la estimulación del complejo gp44/62.

Por su parte, la función de gp41 no ha sido establecida, aunque se sabe que cataliza la hidrólisis de GTP a GDP y Pi, en presencia de DNA de simple cadena (Alberts & col., 1977).

A pesar de estos avances en el conocimiento de las funciones involucradas en la replicación del DNA de T 4, el proceso "in vivo" permanece mucho más oscuro. No se conoce hasta qué punto y cuántas proteínas celulares se emplean en el proceso ni qué productos virales, no necesarios "in vitro", intervienen "in vivo". Una purificación parcial del aparato de replicación de E. coli infectada con T 4, revela la presencia de gp32, gp43, gp42 (dCMP hidroximetilasa), RNA polimerasa y cantidades variables de otras trece proteínas (aparentemente virales). Todos estos productos aparecen unidos a DNA de T 4 (Manoil & col., 1977).

En cuanto al proceso de replicación en SPO 1, hay nueve cistrones cuyos productos son necesarios para la replicación (fenotipo D0) y otros siete que la alteran produciendo fenotipos DD (iniciación retrasada de la replicación) o DA (terminación anticipada de la replicación).

No se han estudiado mutantes de estos últimos siete genes, de manera que no sabemos qué funciones pueden codificar.

Dentro de los genes cuya correcta expresión es requisito para la síntesis de DNA, el 28 codifica una proteína que regula la transcripción. El gen 29 parece ser el estructural de la dUMP hidroximetilasa, aunque no se descarta que gp29 pueda, además, intervenir en la polimerización del DNA (Glassberg & col., 1977 c). Por su parte, gp23 es posiblemente una deoxinucleótido quinasa, pues dos mutantes del gen 23 no complementan con representantes del cistrón 3 (deoxinucleótido quinasa) del bacteriofago SP 82, muy relacionado con SPO 1 (Glassberg & col., 1977 c; Kahan, 1971).

Los seis cistrones restantes, 21, 22, 27, 30, 31 y 32, podrían codificar productos directamente involucrados en la replicación. Cinco de ellos han sido estudiados con mayor detalle. Los genes 21 y 32 codificarían productos necesarios para la iniciación de la síntesis de DNA, no sólo en el primer ciclo de replicación sino en cada uno de los subsiguientes, pero que no participarían en la elongación de las cadenas nacientes (Glassberg & col., 1977 a).

El producto del gen 32 también estaría involucrado en la terminación de la replicación (Glassberg & col., 1977 a).

En cambio, gp22, gp30 y gp31 participarían en la elongación de las cadenas nacientes de DNA (Glassberg & col., 1977 a).

El cistrón 27 no ha sido estudiado hasta el momento, por lo que no puede adjudicársele ninguna función.

Estos últimos conocimientos han sido adquiridos utilizando mutantes sensibles a la temperatura (alta o baja) a los que se permite iniciar la replicación en condiciones permisivas; luego se los transfiere a temperatura no permisiva y se determina en qué

extensión se han replicado los diferentes cistrones. Para esto se extrae el DNA y se prueba su capacidad de complementar con distintos mutantes.

Esta metodología no ha sido acompañada, hasta el momento, por estudios de actividades (catalíticas, de unión a DNA u otras) de los productos de estos genes.

A este respecto, SPO 1 codifica una DNA polimerasa, de P. M. 122000 Daltons y una sola cadena polipeptídica (Yehle & Ganesan, 1972; Yehle & Ganesan, 1973). Esta enzima prefiere como modelos DNAs de doble cadena desnaturalizados (por calor o álcali), preferencia que también exhiben las DNA polimerasas de otros bacteriofagos, como T 2 (Aposhian & Kornberg, 1962), T 4 (Goulian & col., 1968) y T 7 (Grippio & Richardson, 1971). Una característica llamativa de la enzima es su capacidad de utilizar dTTP, dUTP y 5-BromodUTP como sustratos, tan bien como Hidroximetil-UTP (Yehle & Ganesan, 1973).

No se conoce qué cistrón dirige la síntesis de esta DNA polimerasa.

Tampoco se han descripto otras actividades catalíticas en *B. subtilis* infectado con SPO 1, que puedan considerarse involucradas directamente en el proceso de replicación, aunque la dUMP-hidroximetilasa (gp29) podría ser un componente del aparato replicativo (Glassberg & col., 1977 c).

Como vimos anteriormente, se ha propuesto que gp31 actuaría en la elongación de las cadenas de DNA, aunque no se descarta que lo haga también en la iniciación (Glassberg & col., 1977 c).

Nuestros resultados no permiten decidir en qué etapa actúa gp31. En la Figura 10 puede apreciarse que hay síntesis de DNA aún cuando ésta se inicie después de haber elevado la temperatura de incubación de las bacterias infectadas con ts-14-1 y que la síntesis prosigue hasta unos 10 minutos después de la transición térmica (este último efecto puede verse también en la Figura 11). Este

comportamiento parece más propio de un producto que actúe en la iniciación o en una de las vías metabólicas que aportan sustratos a la reacción. Sin embargo, si el gp31 de ts-14-1 poseyera una velocidad de inactivación térmica baja, se obtendría el resultado de las Figuras 10 y 11, aún cuando el producto participe en la elongación de cadenas nacientes de DNA.

Suponiendo que gp31 actuara en la etapa de elongación, es difícil responder a la pregunta de cuál podría ser su función. No parece probable que sea una enzima necesaria para la síntesis de hidroximetil-UTP, a menos que el "pool" del producto de la reacción catalizada por gp31 fuera muy bajo, pues la síntesis de DNA cesa inmediatamente en algunos mutantes del gen 31 transferidos de temperatura permisiva a no permisiva (Glassberg & col., 1977 c). Además, de las enzimas responsables de la síntesis de HMUTP, dos de ellas parecen ser gp29 y gp23 (Glassberg & col., 1977 c; Okubo & col., 1972) y la dTTPasa, enzima inducida por los bacteriofagos del grupo de SPO 1 (Roscoe, 1969 a), probablemente sea normal en ts-14-1, pues la síntesis de DNA bacteriano es completamente reprimida por este mutante a temperatura no permisiva (Figuras 10 y 11; Añón, 1974).

Un resultado que sugiere que gp31 es un componente del aparato de replicación es la necesidad de que se encuentre activo dentro de un margen más o menos estrecho de tiempo (Figura 8).

Si, como se supone, la síntesis de DNA es llevada a cabo por un sistema multienzimático, en el que participan proteínas bacterianas y virales (Eisenberg & col., 1976), es razonable pensar que tal sistema posea una estructura con relaciones espaciales muy precisas entre sus componentes. Es probable que tal estructura requiera un montaje ordenado en el tiempo y si uno de los componentes no está disponible en el momento oportuno, el montaje prosiga de manera anormal, originando un complejo carente de actividad catalítica y no reactivable ante la disponibilidad posterior del producto faltante; o bien, el producto inactivo al momento de su

incorporación al sistema multienzimático puede ingresar a éste, pero origina una estructura incapaz de aceptar al resto de los componentes o, si los acepta, el sistema resulta inactivo.

Hemos visto que cuando la síntesis de DNA se detiene ante la inactivación de gp31, también lo hace la de RNA viral, aproximadamente al mismo tiempo (Figuras 10, 12 y 13). Esta dependencia de la transcripción respecto de la replicación parece estar más influenciada por gp31 que por gp22 (Figura 14), producto que también participaría en la elongación del DNA (Glassberg & col., 1977 a).

Se ha postulado que el acople replicación-transcripción sería consecuencia de que sólo el DNA recientemente replicado estaría en un estado competente para ser transcrito. Esta competencia se iría perdiendo a medida que las DNA ligasas eliminan los cortes en el DNA y, con ellos, probablemente disminuirían las zonas de cadena simple, accesibles a la RNA polimerasa (Riva & col., 1970 a; Riva & col., 1970 b; Cascino & col., 1970).

Teniendo en cuenta lo expresado con respecto a la replicación en T 4, a que gp31 (de SPO 1) actuaría a nivel de elongación y a la dependencia estrecha de la transcripción respecto de la replicación en el mutante ts-14-1, parece probable que gp31 participe en el mantenimiento de zonas de simple cadena en el DNA, que son esenciales para ambos procesos.

Las funciones que podrían intervenir en dicho mantenimiento serían del tipo de gp32, gp44/62 y gp41 del bacteriofago T 4 (las dos últimas son actividades de ATPasa y GTPasa que proveerían energía para mantener abierta la doble hélice). Sin embargo, no deben descartarse otros miembros de la maquinaria replicativa, como, por ejemplo, la DNA polimerasa, especialmente a causa de la limitada información disponible.



## CONCLUSIONES

1. El desarrollo del bacteriofago SPO 1 requiere síntesis de proteinas durante todo el ciclo lítico.
2. El desarrollo del mutante ts-14-1 a 37° C está retrasado alrededor de 10 minutos respecto al tipo silvestre de SPO 1, en cuanto a síntesis de DNA, transcripción tardía y producción de bacteriofagos.  
La iniciación retrasada de la síntesis de DNA (fenotipo DD) es probablemente el defecto primario.
3. En ts-14-1 gp31 es sensible a la temperatura, pero es reactiva-  
ble por descenso de ésta. La síntesis de gp31 no es sensible a la temperatura.
4. La síntesis de gp31 comienza antes de los 15 minutos post-infec-  
ción.  
A los 20 minutos post-infección, gp31 ya ha desarrollado acción suficiente para producir progenie.
5. gp31 tiene un efecto de disparo sobre el desarrollo de ts-14-1, pero su acción (o las consecuencias de su acción) son agotables.
6. La reactivación de gp31 permite la iniciación de la replicación y la elevación del nivel de transcripción virales.  
La inactivación posterior de gp31 detiene la síntesis de DNA y deprime la transcripción hasta los niveles pre-reactivación.
7. La acción de gp31 sobre la síntesis de DNA no requiere trans-  
cripción concomitante. Esto se aplica tanto a la estimulación de la replicación por la actividad de gp31, cuanto a su inhibi-  
ción por inactivación del producto.  
La cantidad de DNA sintetizado por ts-14-1 es proporcional a la extensión del período de acción de gp31.

8. gp31 actúa sobre la transcripción a través de su efecto en la replicación.
9. En ts-14-1 la síntesis de DNA puede ser inhibida por altas dosis de ácido nalidíxico, con una inhibición relativamente baja de la síntesis de RNA.

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

Alberts, B. M.; Barry, J.; Bittner, M.; Davies, M.; Hana-Inaba, H.; Liu, C. C.; Mace, D.; Moran, L.; Morris, C. F.; Piperno, J. & Sinha, N. K. (1977) en *Nucleic Acid - Protein Recognition* (ed. H. J. Vogel) pp 31 (Academic Press, N.Y. U.S.A.).

Alberts, B. M.; Morris, C. F.; Mace, D.; Sinha, N. K.; Bittner, M. & Moran, L. (1975) en *DNA Synthesis and its Regulation, ICN-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology* (eds. M. Goulian; P. Hanawalt & C. F. Fox) Vol. 3 pp 241 (W. H. Benjamin Inc., Menlo Park, Ca, U.S.A.).

Añón, M. C. (1974) Tesis Doctoral. Fac. de Cs. Exactas. U.N.L.P. Argentina.

Añón, M. C. & Grau, O. (1973) VI Congr. Arg. de Biología. Publicado en *Progresos en Biología* (Eds. F. D. Barbieri & A. H. Legname), pp 109, (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina, 1975).

Aposhian, H. V. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 18, 230.

Aposhian, H. V. & Kornberg, A. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 519.

Aposhian, H. V. & Tremblay, G. Y. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 5095.

Bolle, A.; Epstein, R.; Salser, W. & Geiduschek, E. P. (1968) *J. Mol. Biol.* 33, 339.

Brodetsky, A. M. & Romig, W. R. (1965) *J. Bacteriol.* 90, 1655.

Brutlag, D. & Kornberg, A. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 241.

Burkholder, P. R. & Giles, N. H. (1947) *Am. J. Bot.* 34, 345.

Cascino, A.; Riva, S. & Geiduschek, E. P. (1970) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 213.

Cook, T. M.; Brown, K. G.; Boyle, J. V. & Goss, W. A. (1966) *J. Bacteriol.* 92, 1510.

Cregg, J. M. & Stewart, C. R. (1977) *Virology* 80, 289.

Crumplin, G. C. & Smith, J. T. (1976) *Nature* 260, 643.

Doty, P.; McGill, B.B. & Rice, S. A. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 44, 432.

Duffy, J. J. & Geiduschek, E. P. (1973 a) *Fed. Proc.* 32, 646.

Duffy, J. J. & Geiduschek, E. P. (1973 b) *F.E.B.S. (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 34, 172.

Duffy, J. J. & Geiduschek, E. P. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4530.

Duffy, J. J. & Geiduschek, E. P. (1976) *Cell* 8, 595.

Duffy, J. J.; Petrusek, R. L. & Geiduschek, E. P. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2366.

Eisenberg, S.; Scott, J. F. & Kornberg, A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1594.

Fox, T. D. (1976) *Nature* 262, 748.

Fox, T. D.; Losick, R. & Pero, J. (1976) *J. Mol. Biol.* 101, 427.

- Fox, T. D. & Pero, J. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2761.
- Fujita, D. J. (1971) Ph. D. Thesis. Univ. of Chicago, Department of Microbiology, U.S.A.
- Fujita, D. J.; Ohlsson-Wilhelm, B. M. & Geiduschek, E. P. (1971) J. Mol. Biol. 57, 301.
- Gage, L. P. (1969) Ph. D. Thesis. Univ. of Chicago, Department of Biophysics, U.S.A.
- Gage, L. P. & Fujita, D. J. (1969) J. Bacteriol. 98, 96.
- Gage, L. P. & Geiduschek, E. P. (1967) J. Mol. Biol. 30, 435.
- Gage, L. P. & Geiduschek, E. P. (1971 a) J. Mol. Biol. 57, 279.
- Gage, L. P. & Geiduschek, E. P. (1971 b) Virology 44, 200.
- Glassberg, J.; Franck, M. & Stewart, C. R. (1977 a) J. Virol. 21, 147.
- Glassberg, J.; Franck, M. & Stewart, C. R. (1977 b) Virology 78, 433.
- Glassberg, J.; Slomiany, R. A. & Stewart, C. R. (1977 c) J. Virol. 21, 54.
- Goulian, M.; Lucas, Z. J. & Kornberg, A. (1968) J. Biol. Chem. 243, 627.
- Grau, O.; Ohlsson-Wilhelm, B. M. & Geiduschek, E. P. (1970) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 221.
- Grippo, P. & Richardson, C. C. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6867.
- Haslam, E. A.; Roscoe, D. H. & Tucker, R. G. (1967) Biochem. Biophys. Acta 134, 312.
- Horvitz, H. R. (1973) Nature New Biol. 244, 137.
- Huberman, J.; Kornberg, A. & Alberts, B. M. (1971) J. Mol. Biol. 62, 39.
- Johnson, G. G. & Geiduschek, E. P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3571.
- Kahan, E. (1971) Virology 46, 634.
- Lancini, G. C. & Sartori, G. (1968) Experientia 24, 1105.
- Levner, M. H. (1972) Virology 48, 417.
- Levner, M. H. & Cozzarelli, N. R. (1972) Virology 48, 402.
- Linder, C. H. & Sköld, O. (1977) J. Virol. 21, 7.
- Losick, R. & Sonenshein, A. L. (1969) Nature 224, 35.
- Mandell, J. D. & Hershey, A. D. (1960) Anal. Biochem. 1, 66.
- Manoil, C.; Sinha, N. K. & Alberts, B. M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2734.

- Marmur, J.; Greenspan, C. M.; Palacek, E.; Kahan, F. M.; Levine, J. & Mandel, M. (1963) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 191.
- Morris, C. F.; Sinha, N. K. & Alberts, B. M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4800.
- Nygaard, A. P. & Hall, B. D. (1964) J. Mol. Biol. 9, 125.
- Nossal, N. G. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5668.
- Nossal, N. G. & Hershfield, M. S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5414.
- Okubo, S.; Strauss, B. S. & Stodolsky, M. (1964) Virology 24, 552.
- Okubo, S. & Yanagida, T. (1968) J. Bacteriol. 95, 1187.
- Okubo, S.; Yanagida, T.; Fujita, D. J. & Ohlsson-Wilhelm, B. M. (1972) Biken J. 15, 81.
- Pero, J.; Nelson, J. & Fox, T. D. (1975 a) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1589.
- Pero, J.; Tjian, R.; Nelson, J. & Losick, R. (1975 b) Nature 257, 248.
- Pulitzer, J. F. (1970) J. Mol. Biol. 49, 473.
- Pulitzer, J. F. & Geiduschek, E. P. (1970) J. Mol. Biol. 49, 489.
- Rashbaum, S. A. & Cozzarelli, N. R. (1976) Nature 264, 679.
- Ratner, D. (1974) J. Mol. Biol. 88, 373.
- Riva, S.; Cascino, A. & Geiduschek, E. P. (1970 a) J. Mol. Biol. 54, 85.
- Riva, S.; Cascino, A. & Geiduschek, E. P. (1970 b) J. Mol. Biol. 54, 103.
- Roscoe, D. H. (1969 a) Virology 38, 520.
- Roscoe, D. H. (1969 b) Virology 38, 527.
- Roscoe, D. H. & Tucker, R. G. (1964) Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 106.
- Salser, W.; Bolle, A. & Epstein, R. (1970) J. Mol. Biol. 49, 271.
- Shub, D. A. (1966) Ph. D. Thesis. M.I.T., Dept. of Biology, U.S.A.
- Shub, D. A. (1975) Molec. Gen. Genet. 137, 171.
- Shub, D. A. & Johnson, G. G. (1975) Molec. Gen. Genet. 137, 161.
- Siegel, R. B. & Summer, W. C. (1970) J. Mol. Biol. 49, 115.
- Sonenshein, A. L. & Roscoe, D. H. (1969) Virology 39, 265.
- Spiegelman, G. B. & Whiteley, H. R. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1483.
- Stevens, A. (1974) Biochemistry 13, 493.
- Studier, F. W. (1965) J. Mol. Biol. 11, 373.

- Swanton, M.; Smith, D. H. & Shub, D. A. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4886.
- Tjian, R. & Pero, J. (1976) Nature 262, 753.
- Travers, A. A. (1969) Nature 223, 1107.
- Travers, A. A. (1970) Nature 225, 1009.
- Wilhelm, J. M.; Johnson, G. G.; Haselkorn, R. & Geiduschek, E. P. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1970.
- Wilson, D. L. (1969) Ph. D. Thesis. Univ. of Chicago, Dept. of Biophysics, U.S.A.
- Wilson, D. L. & Gage, L. P. (1971) J. Mol. Biol. 57, 297.
- Wilson, D. L. & Geiduschek, E. P. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 62, 514.
- Yehle, C. O. & Ganesan, A. T. (1972) J. Virol. 9, 263.
- Yehle, C. O. & Ganesan, A. T. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7456.