

Tesis de Posgrado

Foto inactivación del bacteriófago MS2 y su ácido nucleico infectivo, tratado con naranja de acridina

Amati, Pablo E.

1962

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Amati, Pablo E. (1962). Foto inactivación del bacteriófago MS2 y su ácido nucleico infectivo, tratado con naranja de acridina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1125_Amati.pdf

Cita tipo Chicago:

Amati, Pablo E.. "Foto inactivación del bacteriófago MS2 y su ácido nucleico infectivo, tratado con naranja de acridina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1962. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1125_Amati.pdf

FCEyN-BA.

DEPARTAMENTO DEL BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA
Avda. Libertador 11320, Ciudad de Buenos Aires
Argentina. C.P. 1200
(1)

Table de Autores

(2)

Departamento de Biología, Massachusetts
Institute of Technology, Cambridge 30
Massachusetts, U.S.A.

Director de Tesis

Professor J. R. Landa

TESIS: 1125

- (1) Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires.
(2, Licenciado en Ciencias Biológicas (1958) de la
Universidad de Buenos Aires.

1962

FCEyN-BA.

GRACIAS

Se desea expresar especial reconocimiento
al Profesor de la UNR, cuya disposición e interés en
el trabajo hizo posible e instructiva la realización
de esta investigación.

Se agradece también al Doctor Le Kots y
al Doctor J. Barrion por haber colaborado en varias
fases de la extracción del RFA de MS2 y por econsejear
toda la consideración sobre métodos y resultados.

El trabajo fue posible gracias a la seg-
tial donación del bacteriófago MS2 por el Doctor J.
Cirio.

FOCEYARBA.

INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
I. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	2
<i>estudios biológicos</i>	2
<i>estudios fisicoquímicos</i>	6
<i>resúmenes del presente trabajo</i>	9
Parte I	
1a- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	11
1b- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN LOS FOTOTRANSFAGOS	12
Método	13
Resultados	14
1b- II- ESTUDIO DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	16
1c- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL TRATAMIENTO CON URANIO	16
I- resumen	17
Método	17
Resultados	17
Parte II	
IIa- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	20
IIb- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	21
IIb- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	26
1c- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	27
IId- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	28
1e- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	30
Parte III	
IIIa- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	32
IIIb- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	33
IIIc- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	35
IIId- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	36
IIIe- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	38
IIId- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL AGUA EN EL RENOVACIONALISMO	43
Resultados	43

FCCEYRA.

Aclima

Cables

45
47
54

RESUMEN

Hasta el presente, en los estudios sobre la foto-inactivación de los bacteriófagos y otros organismos tratados con baranda de meridiana, no fueron aportados pruebas directas sobre el lugar de acción del colorante. Algunos autores (Eusebio, 1966; Pradelfort y Ureta, 1961) mencionaron la posibilidad que el colorante actuase sobre el ácido nucleico o los organismos estabilizadas por éllos.

En el presente trabajo se concluye - al menos para el bacteriófago E. coli, por nosotros estudiado - que el efecto foto-dinámico del Zn de A se ejerce principalmente sobre el ácido nucleico. Se ha visto de comprobó que el ácido nucleico extraído de bacteriófagos E. coli foto-inactivados, no tiene capacidad infectiva a protoplastos de *Escherichia coli* K12, y que es posible la foto-inactivación "in vivo" de complejos de DNA con Zn de A.

En este trabajo son expuestas algunas propiedades más del bacteriófago E. coli, sobre las ya comunicadas por otros autores (Devic et al., 1961), y además se describe la formación, después de tratamiento con fenoal, de partículas subfágicas que mantienen algunas características fundamentales del bacteriófago E. coli (infectividad a células P y R y igual sensibilidad en crecimiento de G10a) adquieren la sensibilidad al tratamiento con HgCl₂.

LITERATURA

El colorante de acridina (N_c de A_c) - 3,7-dimetilacridinacloruro - es uno de los colorantes de la serie de los acridinas, y su fórmula estructural es:

Los estudios biológicos de los efectos de este colorante, son numerosos y de variado tipo. De menor interés son las investigaciones fisicoquímicas de los complejos ácidos nucleicos de la forma "in vivo".

En las páginas siguientes tratarémos de resumir los conocimientos actuales sobre estas líneas de investigación, refiriéndome especialmente a aquellas relacionadas con nuestro trabajo.

Definición Mitocondria

El N_c de A_c es usado, desde hace muchos años, como colorante histoquímico específico para el núcleo de células animales. Esto es debido a que su reacción con el Ácido Desoxirribonucleico (DNA) da un color verde amarillento en contraste con el rojo llameante producido por su combinación con el Ácido ribonucleico (RNA).

Asimismo fue llevada a cabo una interesante investigación referente a la coloración de los ácidos nucleicos "in vivo" (Mayor y Hill, 1961; Mayor y Awan, 1961) demostrando que el RNA del híg-

toridosa p. 174 (que es a veces falsa) de la reacción de coloración del Rb. Esto hace suponer que el tipo de coloración tiene mayor especificidad estructural que química.

Uno de los efectos más conocidos del Rb de A. es el de la eliminación de articulinas citoplasmáticas en microorganismos.

En Sparaco (1930) demostró que haciendo crecer levaduras (Aspergillus niger) en presencia de derivados de coridina (y es principalmente coriflevina, pero el Rb de A. produce análogos efectos, i.e. Monincky comunicación personal) se obtienen colonias significativamente más pequeñas (que llamo "pequeñas colonias") formadas por células de tamaño casi normal, pero deficientes en el sistema respiratorio. Esto se demostró con debido a la pérdida o a la inactivación de partículas citoplasmáticas que regulan la actividad de enzimas.

Con una técnica similar a la usada por Sparaco, Hirata (Hirata 1957, Hirata and Liya 1958 e Hirata 1960), con tratamiento con Rb de A., el factor episiómico determinante de la sexualidad en Aspergillus galli K12. La característica fundamental de este proceso es el efecto exclusivo sobre células P+ y no sobre HfP, siendo ésto interpretado como indicio que el episo me debe encontrarse en posición citoplasmática pero sea susceptible al tratamiento.

Posteriormente otros episomas de Aspergillus se demostraron esterilizables por el Rb de A.: el drug resistant factor (DRF). Los prefijos λ y Φ y algunos factores ciliocigóticos no son sensibles al tratamiento con Rb de A.

Como agente mutágeno el $\text{H}_2\text{de A}$ fue poco usado pues, en comparación con otros compuestos de la serie de los acridinas (especialmente el amarillo de acridina y la proflavina) demostró ser menos efectivo (Orgel y Brenner, 1961). De todos modos los estudios realizados con aquellos compuestos sobre los bacteriófagos (De Març, 1953; Brenner *et al.*, 1961) ^{H2 de A} demostraron que el efecto mutagénico de los acridinas es debido a lo que Brenner y colaboradores (Brenner *et al.*, 1961) definieron como "mutación por inserción o delección de un par de bases" - en adición a la mutación por "transloción" y "transversión" /por Prosser (1961) - y esto significa deido (en base a estudios que referiremos posteriormente) a que tales sustancias se insertan entre pares de bases en la molécula de DNA produciendo - durante la duplicación - la copia de un error, que consistiría en la adición o subtracción de un par de bases en el nuevo DNA sintetizado.

Finalmente otro efecto biológico estudiado es el de la inactivación por la luz (foto inactivación) de organismos tratados con $\text{H}_2\text{de A}$. En 1933 Clifton -por primera vez- describió la inactivación de bacteriófagos de estafilococcas, y desde entonces se ha estudiado el efecto fotodinámico de este colorante en varios microorganismos, concentraciones inactivadoras en bacterias y levaduras (Freifeldow y Brata, 1961), y en varios virus animales y bacterianos (1).

Crowther y Belnik (1961) describieron la fotoinactivación del poliovirus tratado con $\text{H}_2\text{de A}$ siendo éste el primer ejemplo de inactivación de virus cuyo material genético es el RNA. En este caso el efecto, y presumiblemente la incorporación del colorante, se obtuvo sólo durante la multiplicación intracelular del virus. La sucesión de

(1) Una óptica monografía sobre la acción biológica de los colorantes en base a los estudios hasta 1961, ha sido publicada por E. P. Blum (1961).

incorporación "in vivo" es probablemente debido a la impensosabilidad de la envoltura proteica.

En 1958 Yamamoto publicó un detallado estudio sobre el efecto fotodinámico de varios colorantes sobre los califagos de la serie F.

En experimentos preliminares el autor confirmó las siguientes observaciones, estudiadas por otros autores, 1) La inactivación es función exponencial del tiempo de exposición a la luz, 2) La acción fotodinámica aumenta con el aumento del pH y el descenso de la salinidad del medio, 3) La acción fotodinámica necesita de condiciones aeróbicas para actuar y 4) que la relativa sensibilidad de los varios bacterifagos, a la acción fotodinámica, es correlativa a la clasificación serológica de los mismos.

En su trabajo, estudió la constante de inactivación de varios colorantes, y especialmente interesante es la descripción del efecto competitivo de algunos colorantes inactivos hacia la acción fotodinámica de los colorantes activos. Este fenómeno de competencia entre substancias de estructura similar, hace suponer que los lugares de inserción y acción de las moléculas del colorante, son limitados.

Yamamoto también calculó, en base a la ecuación de Michaelis-Menten, la reacción de inactivación del complejo fago-colorante, observando paralelismo con las reacciones enzima - sustrato.

El autor propuso una estructura a puente para la unión de los colorantes a la subunidad X, lugar de acción del efecto fotodinámico, y avanzó la hipótesis que dicha subunidad X fuese el ácido nucleico de los bacterifagos.

Estudios fisicoquímicos.

Como fue mencionado anteriormente, el hecho que el R. de A. fuese un colorante selectivo para los ácidos nucleicos, era conocido por su empleo en coloraciones histológicas.

Varias investigaciones fueron realizadas a fin de determinar el tipo de interacción que une el R. de A. con los ácidos nucleicos, purificando como también a otras polianiones.

En 1954 Northland y colaboradores iniciaron el estudio espectrofotométrico de la interacción de los colorantes de acridina con los ácidos nucleicos, concluyendo que el complejo colorante a.n. está sujeto por algo más que simples atracciones electrostáticas, y que el grado de polimerización del DNA tiene marcado efecto en la formación de dichos complejos.

Steiner y Boero (1958) demostraron que la combinación entre el ácido poliadenílico y el R. de A. implica una interacción entre el colorante y el anillo adenilico, pero ésto no ocurre en el caso de los complejos R.A.-R. de A., probablemente porque la cianina sería incompatible debido a la ligadura hidrógeno con Tiamina, por ello la unión del colorante sería por combinación con los grupos fosfato, (Boero *et al.*, 1958).

Bradley y Galf (1960) en base a estudios espectrofotométricos, propios y a los previamente mencionados, proponieron un modelo de interacción del R. de A. con polímeros a hélice (Fig. 0-1) en el cual ejemplifican la unión idéntica del colorante con los grupos fosfatos y la interacción entre moléculas vecinas del R. de A. dada por los electrones N orbitales.

Figura 0-1

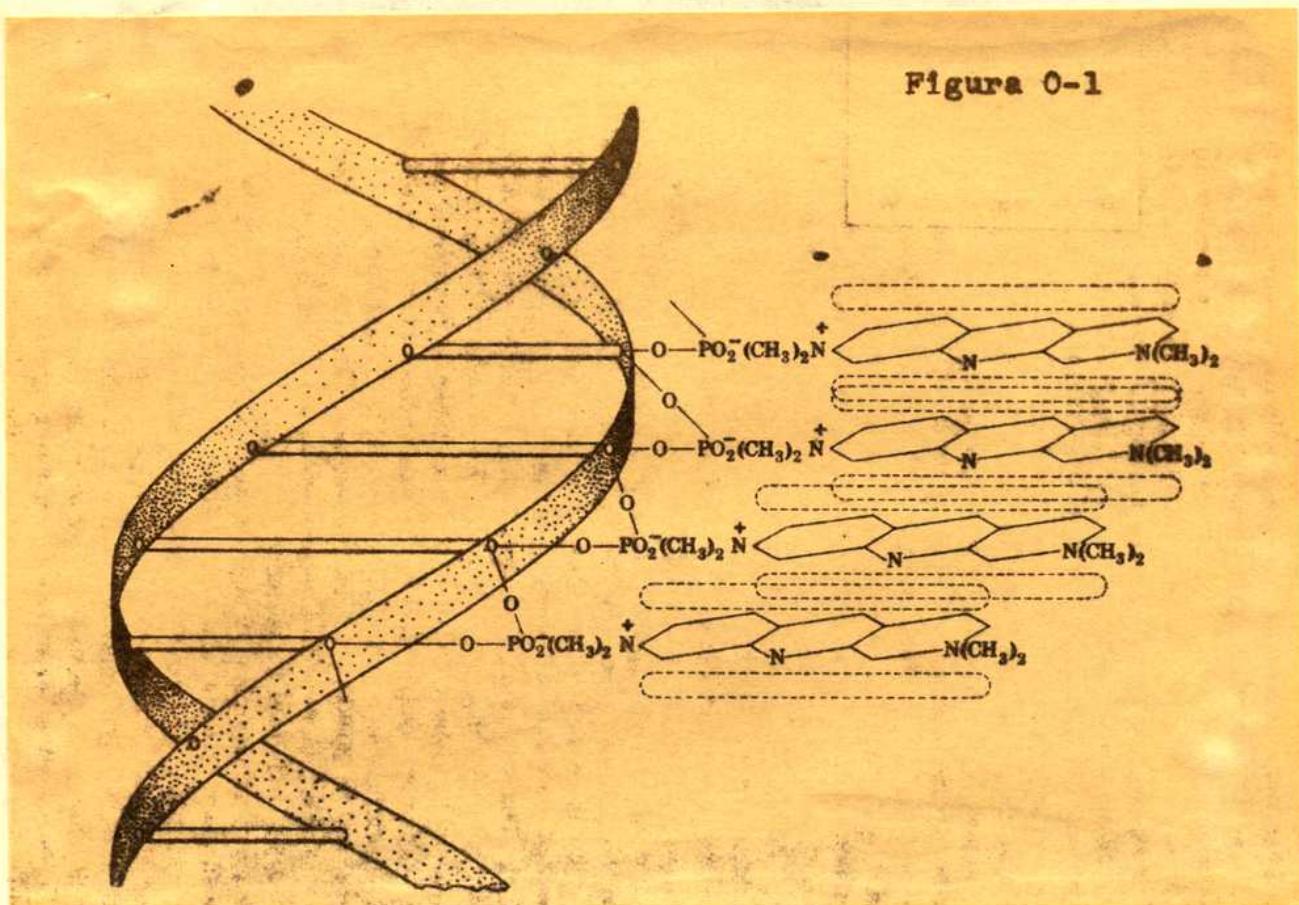


Figura 0 - 1

Modelo idealizado de una unión posible entre colorante y polímeros. El polímero helicoidal es mostrado, a la izquierda, con los grupos fosfato expuestos fijando la posición del colorante N. de A. unido a él.

(Reproducido de Bradley y Wulf, 1960)

tales.

Este modelo se concuerda con el propuesto por Lerman (1961),
que en base a estudios de difracción de rayos X y de viscosidad de
complejos DNa de A_n y de otras acridinas obtuvo los siguientes re-
sultados: 1) la masa por unidad de longitud es inferior para los com-
plejos que para el DNA; 2) que las moléculas en fibra, del comple-
jo, están más densamente empaquetadas que en el DNA de configuración
B; 3) que el espaciado de 3,4 Å a lo largo de la hélice es mantenido;
4) la molécula es estirada en solución, en oposición al efecto electro-
estático; 5) La estructura a hélice regular es mantenida.

En base a estos resultados el autor infiere que el modelo más
probable es el de intercalación de las moléculas del colorante en
la hélice, por extensión del eje central. Este modelo es también con-
cordante con el estudio sobre la estructura fina de los mutantes de
acridina realizado por Crick y colaboradores (1961).

Finalmente Freifelder, Devián y Ondanochuk (1961), estudiaron
por coeficiente de sedimentación, viscosimetría y densimetría térmica,
la lisis provocada por la lisina visible al DNA en complejos con 5
de A_n, concluyendo que el DNA se desplaza y que dicho desplazamiento
ocurre aparentemente sobre por cadaión de la siringual cadena, si bien
oción por doble cadena no se excluye. La desestabilización de la
estructura secundaria es probablemente debida al efecto químico de
los componentes de cada siringual cadena (desoxirribosa, purinas y pirí-
midinas).

Introducción del presente trabajo

Como se ha mencionado previamente, el único ejemplo de fotoinactivación, por tratamiento con R. de A., de organismos cuyo material genético es RNA, fue realizado con Poliovirus por Crouther y Melnik (1961).

Muchos autores solamente encontraron acción fotodinámica cuando el colorante era incorporado durante la multiplicación intracelular del virus.

Nosotros nos proponemos estudiar si organismos, cuyo fondo nucleico es DNA, son también sensibles al tratamiento con R. de A. "in vivo", y además confirmar la exposición, avanzada por varios autores, que el efecto fotodinámico del colorante se actúa sobre el fondo nucleico.

Para tal propósito hemos elegido el bacteriófago E32, que tiene como propiedad fundamental de ser a DNA, y de que éste es infectivo a protoplastos de *E. coli* K 12. Esto nos permite también realizar comparaciones entre el efecto fotodinámico del R. de A. sobre organismos a RNA y DNA y también sobre el DNA en partículas virales y ciclada.

Los experimentos que describiremos fueron diseñados para contestar las siguientes cuestiones:

- 1) Son los organismos, cuyo material genético es RNA, sensibles al efecto fotodinámico si son tratados con R. de A. "in vivo"?
- 2) Hay diferencia significativa entre la sensibilidad a la fotoinactivación entre organismos a RNA y DNA?

- 3) o inactivado el RNA "in vivo"?
- 4) si el RNA inactivado "in vivo", la actividad de este proceso es la misma que en el RNA se encuentra dentro de partículas virales., donde probablemente tiene un ordenamiento determinado y rígido (estructura secundaria).

Parte I

CARACTERISTICAS DEL BACTERIOPAGO K32

INTRODUCCION:

El bacteriófago K32, aislado por el Dr. J. Clark en Berkeley-California, es específico de *Escherichia coli* K12 portador del factor sexual '*f'*', sea en forma independiente (*F+*) o como forma integrada (*W_F*).

Las características fundamentales son: a) está compuesto por ácido ribonucleico y proteína, b) su densidad es 1,46 en gradiente de CsCl, y c) tiene forma polihédrica de diámetro aproximado a 24 nm (Davis et al. 1961). Su tiempo de latencia es de 30-60 minutos y el "burst size" es de aproximadamente 20.000 partículas por bacteria. (Lo Katz comunicación personal)

En este capítulo describiremos otras características estudiadas por nosotros, así como también los métodos usados para la producción del bacteriófago.

Ley de Osmosis y el Bacteriophage

Materiales: (1)

Caldo LB: Yeast extract difeo 0,5 %, suero triptona difeo 1 %, CaCO_3 1 %, pH ajustado a 7 con NaOH .

Agar LBO: Caldo LB solidificado con 1 % de suero agar difeo más 0,1 % de glucosa y 2×10^{-3} M CaCO_3 , agregadas en el momento de preparar las cajas de Petri.

Agar Triptona: 1 % suero triptona difeo, 0,25 % CaCO_3 y 1 % agar.

Agar Hessey:

Agar blandos 0,9 % "Nutrient Broth" difeo en polvo, 0,5 % CaCO_3 , 0,65 % agar. Antes de sembrar las bacterias y bacterifagos se agrega 2×10^{-3} M CaCO_3 .

Solución salina: 0,85 % CaCl_2 , pH 6,5.

Buffer Tris: Tris (hidroximetil) amino acetato "Sigma" 121 0,01 M, ajustado a pH 8,3 con CaCO_3 .

Copas bacterianas: (2)

Origen

<i>E. coli</i> K12	3.000	SFR prototípico	J. Monod
	24032	SFR ($\text{TL } \frac{1}{2} \text{ hr}$)- /T1	J. Lederman
	44132	P- prototípico	"
	2.000	P- ($\text{TL } \frac{1}{2} \text{ hr}$)- Δm^2	J. Monod
	13409	SFR prototípico Δm^2	Melberg

1- Los Materiales y Copas bacterianas suministrados son

Bacterifagos:

Bacterias E. coli gentilmente cedida por el Dr. Jo Clark . T6 r+ de la colección del profesor de Dr. Luria.

Método:

Bacterias E. coli 3.000 en fase logarítmica de crecimiento a 37°C., en 1.3, a una densidad aproximada de $3\cdot5 \times 10^8$ células /cc., son infec-
tadas con el bacterifago T6 a una multiplicación de alrededor de 4

las que se usaron comúnmente, en cada capítulo se describirán los ma-
teriales específicos adicionales si fuera necesario.

De adelante cuando nos referiremos a "bacterias" sin otra espe-
cificación, entendemos al uso de la cepa E. coli 3.000.

Conjuntamente con el bacteriófago se adiciona al medio Ca_2O_4 a una concentración final de $2 \times 10^{-3} \text{M}$.

La cultura es luego manteniida a 37° con vigorosa agitación (tanto por agitación o por burbujeo de aire filtrado) por 4 1/2 horas. Posteriormente se sedimentan las bacterias por centrifugación y el sobrenadante se filtra a través de filtros "milipores" (de poros de μm 0,45 de diámetro) lo que permite la completa esterilización de la suspensión fágica. Los lisados son mantenidos en heladera a 4°C .

Resultados:

Con el método descripto se obtienen lisados con título aproximado de 6×10^{12} bacteriófagos por ml. Estudios realizados por nosotros demostraron que el Ca favorece la mejor adsorción del fago (como en el caso del bacteriófago Pl, Bastoni 1951) y éste debe ser agregado al medio conjuntamente con MS2 para obtener títulos elevados.

La cantidad de fago obtenido es proporcional al tiempo de incubación hasta las 4 1/2 horas y luego decrece, siendo ésto debido a la reabsorción de parte de las células sobrevivientes.

No se observa lisis masiva de las bacterias (como en el caso de infección de otros fagos virulentos) y ello es debido a que MS2 es capaz de lisogenizar defectivamente (Aarti, resultados no publicados).

La obtención del fago por el método de siembra con bacterias en cajón de Petri (Adams 1950) es posible y da títulos ligeramente superiores, pero que no justifican el mayor manipuleo.

y el menor voltaje obtenible.

Había un falso estable, pero a él le un documento inicial en el título de los límites, de aproximadamente un factor 3-5, no ha podido ser evitado (independientemente del método usado para obtener los límites).

Es probable que la razón de esta inexactitud sea similar a la encontrada, para igual efecto, por R. Tamm (comunicación personal) en el caso del colifago 513 o con la multiplicación de pago de los artificiales visuales por mallas de pared estables, que debido al diámetro tomado, sobreponen el funcionamiento de purificación.

IV- TIPO DE PLACA DE BACTERIA VIRALES

El tipo de placa producida por RSV, usando el método descrito por Adams 1950, es similar a la de los colifagos S3, f1 174 y f2, se caracterizaban por ser grandes (aproximadamente 4 mm de diámetro) y por tener bordes difusos con abundante crecimiento de bacterias en toda la superficie.

Otra característica de las placas de RSV es que si se examinan bacteriófagos en bacterias E. coli con más turbidez e impurezas que si se examinan en bacterias RSV.

Se han probado diversos medios de cultivo, y si bien la especie varía ligeramente, mantienen constantes las características fundamentales.

Durante todo el período que se ha estudiado este bacteriófago, se han buscado marcantes morfológicos (de placa) sin haberse obtenido resultados positivos.

IV- TIPO DE PLACA DEL BACTERIO VAGO 820

El tipo de placa producida por 820, usando el método descrito por Adams 1950, es similar a la de los cultivos 323, pl 174 y 52. Se caracterizan por ser grandes (aproximadamente 4 mm de diámetro) y por tener bordes difusos con abundante crecimiento de bacterias en toda la superficie.

Otra característica de las placas de 820 es que se observan bacteriomorfos en bacterias *S.* ellas son más turbias o impuras que si se observan en bacterias 323.

Se han probado 12 varillas cada de cultivo, y si bien la separación varía ligeramente, continúan cumpliendo las características fundamentales.

Durante todo el período que se ha estudiado este bacteriomorfo, se han buscado nutrientes auxológicos (de placa) sin haberse obtenido resultados positivos.

10.- EL ALBALANADO DEL FAGO K2 AL TRATAMIENTO CON SÍLICE Y PECTINA

Materiales:

Klasse Sigma Biochemical Company

Pectina

Buffet Broth pH 6,3

Método:

El tratamiento del fago K2 con sílice se efectuó tanto "in vitro" como durante infeción a bacterias. El tratamiento "in vitro" se realizó diluyendo una solución acuosa fría de la sílice en una suspensión bufferizada (pH 6,3) de bacterifágico, e incubando ésta por 30 minutos a 37°C. Luego de lo cual se tituló el fago sobreviviente.

Controles sin sílice fueron realizados paralelamente.

Para el tratamiento durante infeción de bacterias sensibles, se ha adoptado el método de adición de sílice a variadas concentraciones al agar blando en el que se incubaron bacterias y un número predeterminado de bacterifágicos. Luego de incubación a 37°C por ocho horas, se examinan las placas de límite.

El estudio del efecto de la enzima proteolíptica "Pectina" se realizó en forma similar a la de la sílice.

Resultados:

El fago K2 es bastante resistente al tratamiento con sílice "in vitro" sin embargo altas concentraciones de sílice (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

no evidencia la impereabilidad de la enzima pectolíptica a este com-

sina. Como veremos luego (17a) si dicha enzima proteina es lisisada, las partículas se tornarán sensibles a la acción de la RNasa.

La inactivación del fago, cuando la RNasa se hace actuar durante la infusión a bacterias sensibles, es proporcional a la concentración de la enzima en el medio, y como muestra la figura 1-1 es significativamente inferior a la descrita por Zinder (1962) para el bacterifago ϕ 2, en cuyo caso $0.1 \mu\text{g}/\text{cc}$ de enzima inhibe completamente la formación de plaques de lisis. No se ha podido usar concentraciones mayores de la que muestra la figura 1-1 para las células con sensibles a dichas dosis de RNasa (1).

Experimentos realizados con PRIM-2, que es una enzima proteolítica de amplio espectro de acción, demuestran la total resistencia del fago M2 a esta enzima hasta concentraciones de $50 \mu\text{g}/\text{cc}$.

CONTRARIO:

- (1) Es de hacer notar que en la curva de la Figura 1-1 la extrapolación a $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ de RNasa en el medio no coincide con el control y que una posible fuente de diferencia (que no justifica con todo la diferencia de M2 con ϕ 2) es que en los experimentos realizados por nosotros sólo hemos adicionado RNasa al agar blando y éste podría dar una dilución de aproximadamente 10-20 veces por la difusión de la enzima en el agar duro.

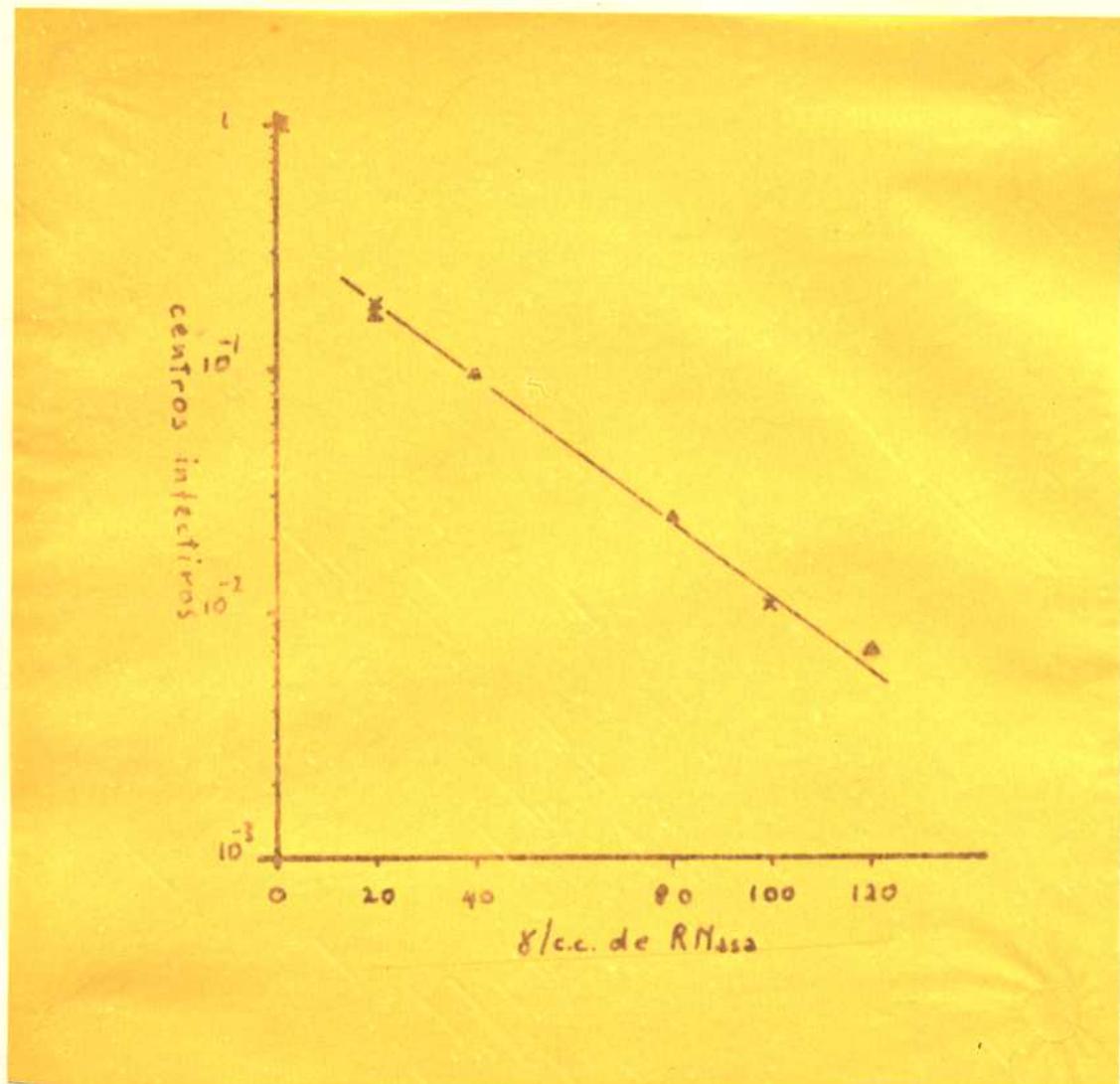


FIGURA I - 1

Inactivación de MS2 por acción de la RNasa durante infeción.

Para detalles experimentales ver texto

X : experimento 1 , A : experimento 2

Parte II

EFECTO FOTODINAMICO DEL NARANJA DE ACRIDINA SOBRE EL BACTERIOFAGO MS2

INTRODUCCION.

En el presente capítulo se describirán los experimentos concernientes a la fotonactivación del bacteriófago MS2 tratado con Naranja de acridina.

Serán expuestos los datos concernientes a la velocidad de la reacción, su dependencia de la concentración del colorante, del pH del medio, y del tipo de los inactivantes. También serán mencionados datos concernientes a la reversibilidad del tratamiento con el colorante y la influencia del tratamiento respecto a la sensibilidad del bacteriófage a la inactivación con los ultravioleta (UV).

AS-13407-VAC S DE K₂O₈ TRATADO CON SABANJA DE ACRIDINA A pH 6,5.

Materiales:

Sabanja de acridina (N_H de 4%) de "National Aniline Co." y Marañón de azidina pura fronda (como descrito en Preifeldes, 1960) gentilmente cedido por el Doctor B. Preifeldes.

Fuente de luz: lámpara fluorescente G. E. "las fada" de 20 watt a 12,5 cm. de distancia.

Otros a terminos descritos anteriormente. A modo de menciones específicamente lo contrario, se ha usado RCP 1.000 para titulación y vegetación del fago.

Métodos:

Una colada estéril de marañón de azidina (1mg/cc) en agua destilada, se diluye en la suspensión fágica (en salmuera salina) a fin de obtener la concentración final deseada. La mezcla así obtenida es mantenida, al abrigo de la luz, a 20° C. por 24 horas, luego de lo cual se expone a la luz y a diferentes intervalos de tiempo se recogen muestras para la titulación del fago sobreviviente. El tratamiento a la luz inactivante se efectúa a temperatura ambiente y en cuarto oscuro con fuente de luz auxiliar (que puede no tener efecto inactivante). La lámpara se encuentra a 12,5 cm. del ejemplar.

En cajas de petri, donde se efectúa la titulación, con también inclinado al abrigo de la luz.

Resultados:

Experimentos realizados a diversas concentraciones de K_2O_8 de 0 a 4%

mostraron que la velocidad de inactivación es proporcional a la concentración del colorante. No hemos observado diferencia entre las dos preparaciones de $\text{H}_2\text{ de } \text{A}_0$ usadas.

Como puede observarse en la Fig. II-1, la inactivación es exponencial en el primer período para lujoos tratamientos menos eficiente. Esto puede ser debido a que la alta concentración de fago inactivado, en las series de titulación, permiten la "reactivación por multiplicidad". La reproducibilidad de las curvas de inactivación demuestran que 24 horas a 20° C. son suficientes para obtener la máxima absorción del colorante. Pruebas realizadas con las mismas soluciones fágicas mantenidas por mayor tiempo en estas condiciones, no mostraron incremento en la eficiencia de inactivación.

En la Fig. II-2 se muestra la inactivación del fago MS2 en comparación a la de T6 tratado de igual modo. Como puede observarse, la razón de inactivación es radicalmente mayor para MS2 pose a ser de dimensiones extraordinariamente menores, esto es probablemente debido a que siendo su ácido nucleico a singula cadena es suficiente una lesión para inactivarlo. Esta interpretación será discutida más adelante. En el curso de esta investigación no se ha podido obtener fagos consistentes al tratamiento con $\text{H}_2\text{ de } \text{A}_0$ y las curvas de la Fig. II-1 muestran como los niveles de inactivación son mucho mayores de los esperados para la detección de mutaciones.

Figura II-1

FOTO-INACTIVACION DE MS2 TRATADO CON N_e de A_s

- Δ 0,04 gm/ml. de N_e de A_s
- 0,2 gm/ml. de N_e de A_s
- × 0,5 gm/ml. de N_e de A_s
- 2,0 gm/ml. de N_e de A_s
- Control sin N_e de A_s

ordenadas: tiempo de exposición a la luz en minutos

abscisas : Bacteriófagos sobrevivientes (escala log.)

Figura II-2

COMPARACION DE LA FOTO-INACTIVACION DE MS2 Y T6

círculos : T6 tratado con 2 gm/ml. de N_e de A_s

cuadros : MS2 tratado con 2 gm/ml. de N_e de A_s

ordenadas y abscisas como en la figura II-1

Figura 1

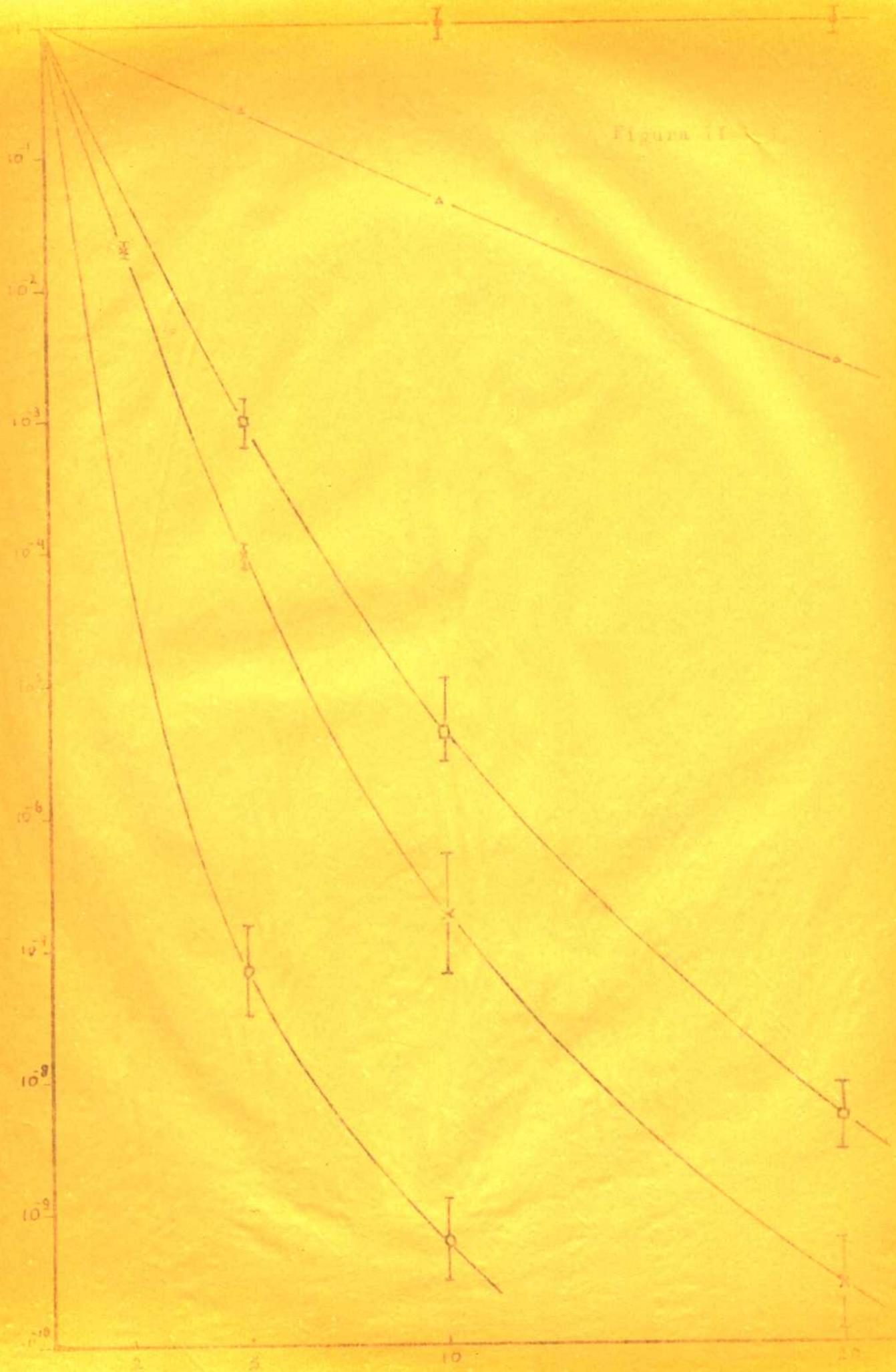
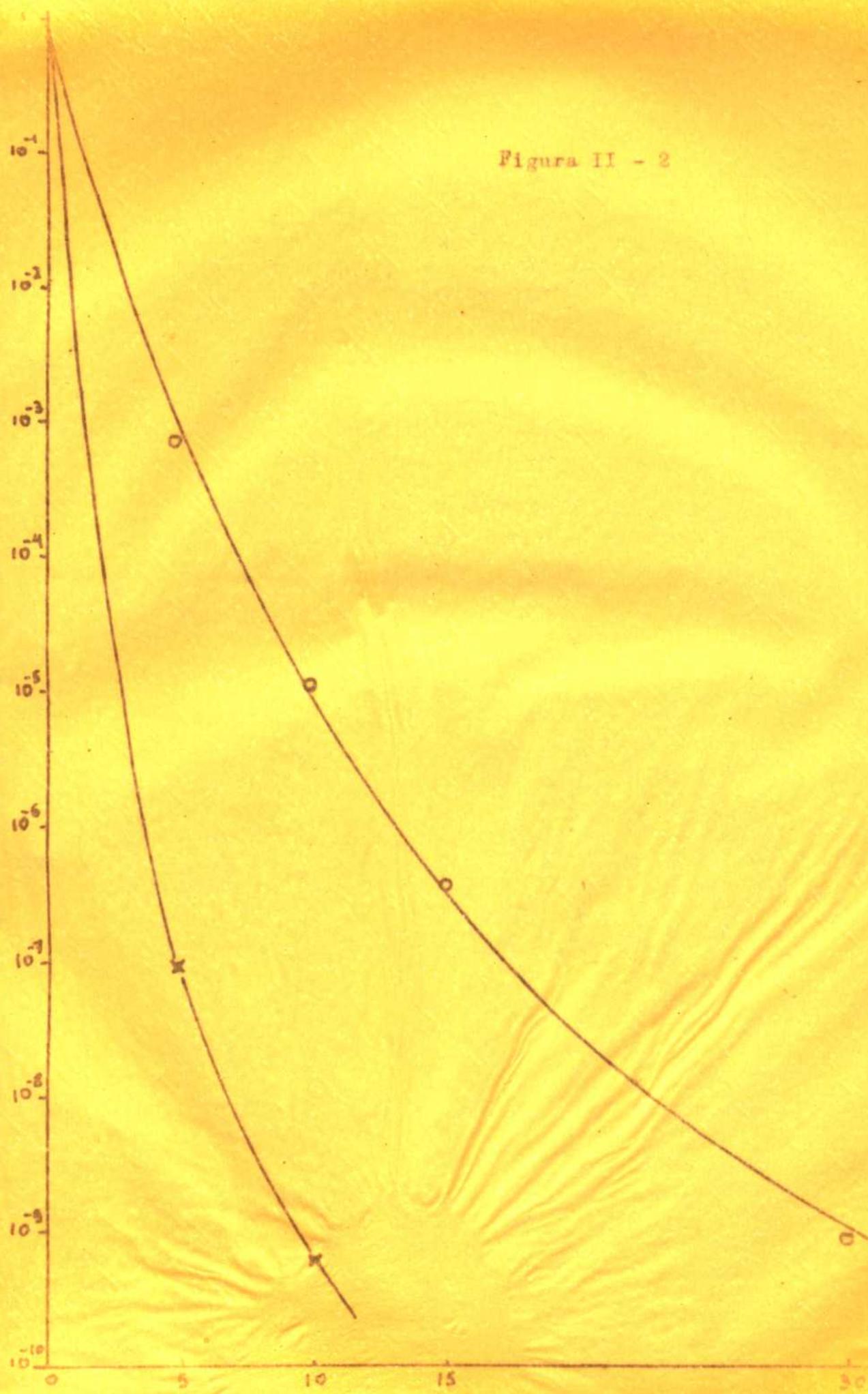


Figura II - 2



III- REVERSIBILIDAD DEL TRATAMIENTO CON N.₆ DE A.

Método:

Suspensiones fágicas tratadas con N.₆ de A. como fue descrito en el párrafo precedente, fueron diluidas 100 veces en solución salina sin calórente y mantenidas en reposo 24 horas a 20° C., después de lo cual fue medida la inactivación por la luna.

Resultados:

Los datos obtenidos mostraron la pérdida de la sensibilidad a la luna, demostrando que la absorción del calórente en el fago es reversible.

Esto indica que el N.₆ de A. no está combinado químicamente al ácido nucleico ni está sujeto al mismo en forma rígida. Más probablemente su permanencia dentro la envoltura protética es debida a un equilibrio entre los dos medios. Estos resultados están diciéndose conjuntamente con los experimentos sobre la unión del calórente con el ácido nucleico libre.

DOS- INACTIVACION DEL BACTERIÓFAGO POR COLORANTE EXPRESO

Método:

El bacteriófago M52 se pone en contacto con naranja de azufre-dina 30 minutos antes de exponerlo a la luz inactivante.

Resultados:

Si el fago es puesto en contacto con el colorante por un periodo inferior a 30 minutos antes de medir su inactivación a la luz, no se observa ningún efecto fotocinético del tratamiento.

La inactivación aumentará proporcionalmente con el tiempo de contacto. Esto es sugestivo al efecto de sostener la necesidad de penetración del colorante dentro de la envoltura proteica del fago, para que actúe en su forma inactivante. Similares resultados han sido descritos para otros bacteriófagos (Iannotti 1998) y observados por nosotros en el caso de T6.

III-4- SENSIBILIDAD A LA INACTIVACION POR U.V. DEL FAGO TRATADO CON Σ_0 DE A_e

Método:

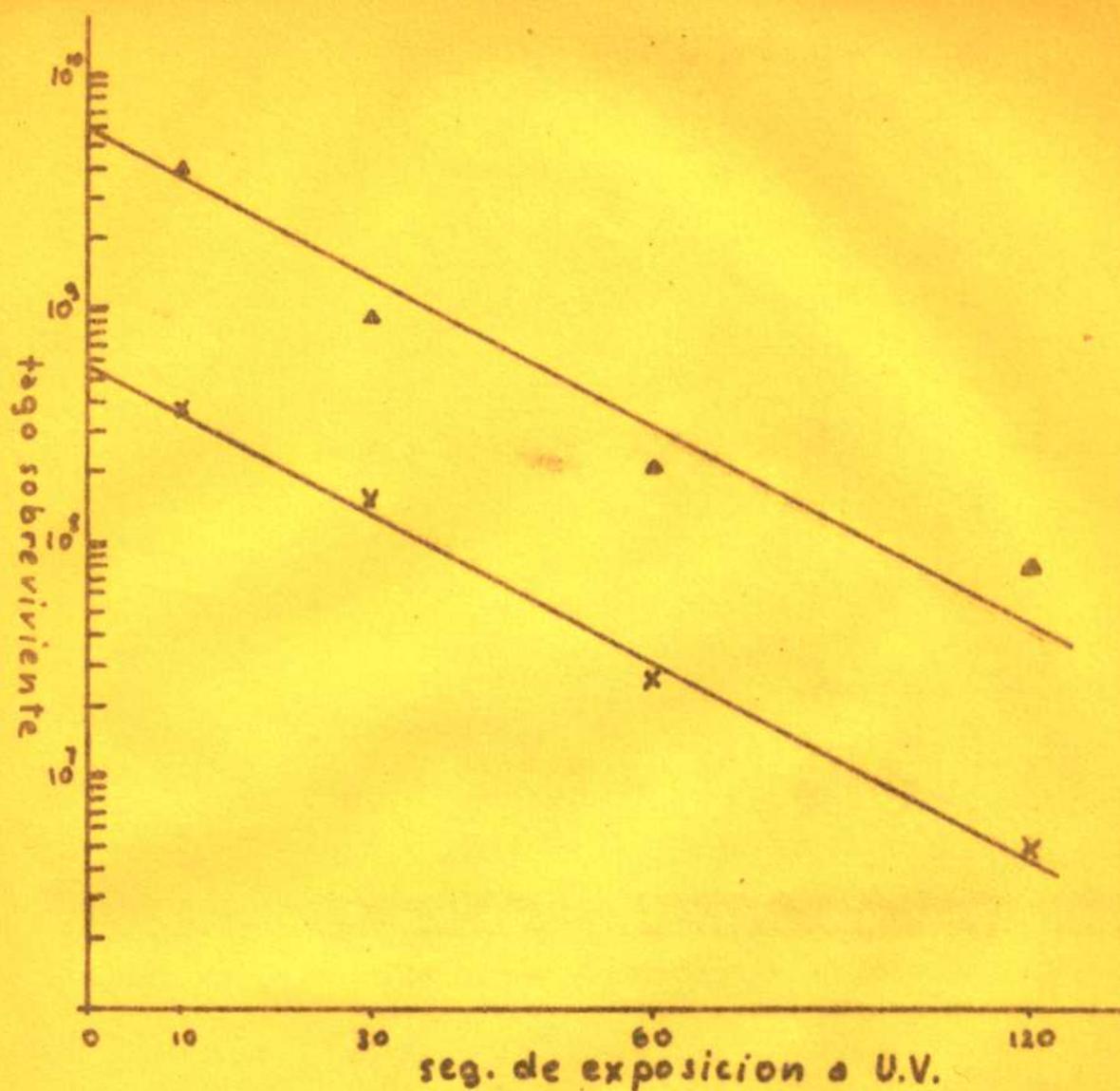
Bacteriófagos 252 tratados con $2 \mu\text{g}/\text{cc}$ de Σ_0 de A_e fueron expuestos a la luz U.V. de una lámpara OS "geometría" de 15 watt a 30 cm de distancia. A intervalos dados se titulaban los fagos sobrevivientes tomando precauciones para evitar la inactivación o fotoinactivación por la luz visible.

Resultados:

No se ha observado diferencia en la inactivación entre el fago tratado con el colorante y el control.

Como lo demuestran las curvas de la Fig. III-3, ambas preparaciones fágicas son extremadamente resistentes a este factor de inactivación.

Experimentos realizados con el bacteriófago 96 demostraron igual sensibilidad respecto al efecto del tratamiento con Σ_0 de A_e en la sensibilidad a U.V.

Plano II - 3

SENSIBILIDAD AL U.V. DE M32 .

Triángulos negros : M32 en Solución Salina

Cruces : M32 en Solución Salina con 2 % de NaCl

III.- INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA EFICIENCIA DE INACTIVACION

Materiales:

Buffer Tris pH 8,3 ; solución 0,01 M Tris (hidroximetil) amino acetato "Sigma 121" ajustado a pH 8,3 con Cl₂N.

Buffer Tris pH 7,4 ; idem al anterior pero ajustado a pH 7,4.

Solución salina ; 0,85 % Na Cl pH 6,5.

Método:

El fago tratado con 0,5 μ g/ml es de E₀ de A₀, como demosriyto precedentemente, en las diferentes soluciones a pH 8,3; 7,4 y 6,5, fue expuesto a la luz y medida su inactivación.

Resultados:

Contrariamente a los resultados de Yamamoto (1958) para la inactivación de T3 por E₀ de A₀, en el presente caso la inactivación es mayor si el tratamiento se realiza en medio ácido. En la Fig. III-4 se muestran las curvas, que como se nota, son relacionadas a la eficiencia del medio.

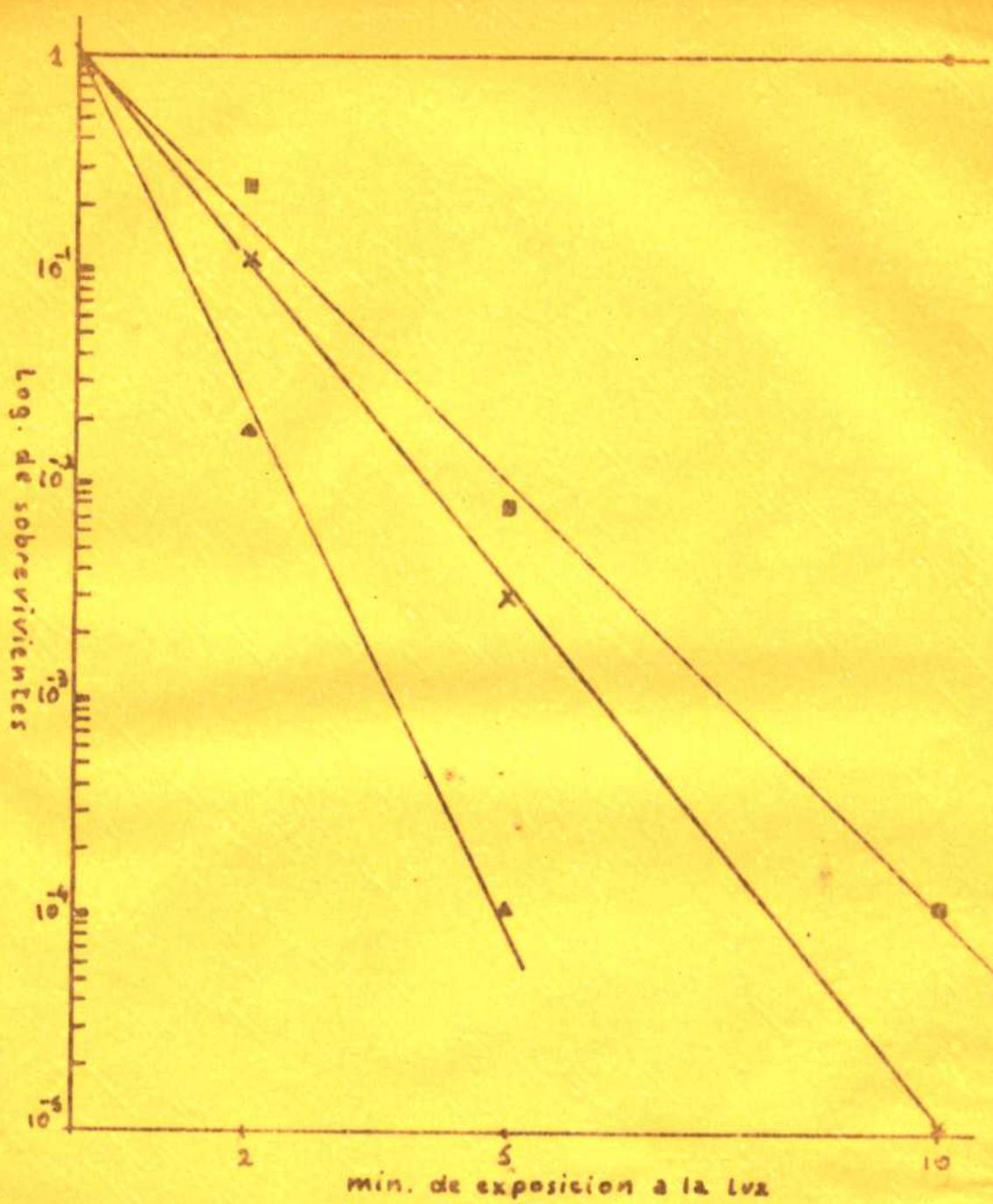


Figura 11-4

POTENCIACION DE RAD A DIVERSOS pH

- Tris pH. 8,3
- × Tris pH. 7,4
- ▲ Solución salina pH. 6,5

Parte III

EXTRACCION Y ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LA FOTOLABILIZACION EN COMPLEJOS CON CATALISIS DE ACERENINA, DEL ACIDO NUCLEICO DE MS2

INTRODUCCION

Davis et al. (1961) han descripto la infectividad del RNA de MS2 a protoplastos de *E. coli* K12, observando que ella es independiente de que los protoplastos sean de células *F+*, *Hfr* o *RFr*.

En el presente capítulo se dan descripciones los métodos de extracción y estudio del ácido nucleico de MS2, como también la capacidad infectiva del mismo, en complejos con *E. coli* K12, luego de exposición a la luz visible.

También describen también las partículas subfijadas, obtenidas durante la extracción del RNA, que tienen como características el mantener la infectividad a células *F+* e *Hfr*, tener una alta densidad en gradiente de CsCl e cuando adquieren la sensibilidad al tratamiento con RNase.

13- Extracción del fondo malolítico de MZP

Materiales:

buffer borato versene : 40 partes de solución saturada (a 4°C.) de tetraborato de sodio, pH 9,1 y una parte de solución 0,1 M versene pH 7,0

Método:

Al bacteriología se le produjo usando 5 litros de cultura de MZP 3000, usando el mót. de recíproco en la, y circulado por burbujas de aire comprimido en un frasco de 8 litros por 4 1/2 horas a 37° C. Desechado de la incubación con el frasco al final de dicha incubación, la cultura fue enfriada aproximadamente 300 gr./l. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Se dejó formar el precipitado por aproximadamente 4 horas y luego fue recogido el mismo por centrifugación.

El precipitado se recuperó en 100 ml. de buffer borato-versene pH 7,0. La solución fue diluida con 4 litros del mismo buffer a 4°C. Luego fueron alejadas las bacterias por centrifugación y filtrando el suero restante por filtros miliporeos de poros de 0,45 de milímetro.

Los bacteriología, así purificados, fueron concentrados 10 veces por centrifugación en la centrifuga Spinco modelo L con el rotor 31 a 30.000 rev./min. por 4 horas.

La suspensión sf. con así obtendida, fue titulada y calculada la recuperación en base al título inicial. La media de recuperación de este mót. es de aproximadamente del 19 %, dando una suspensión final

de aproximadamente $2-4 \times 10^{14}$ unidades infectivas / ml.

Jugoslavias fágicas así preparadas, fueron tratadas con igual volumen de feno (redestilado) saturado con agua, agitando suavemente por 5 min. Centrífugando a 6.000 rev./min., en una centrifuga Servall refrigerada, por 15 minutos se dividen las tres fases (fundida, protoplásmica y acuosa—cobrestandante en la que se encuentra el RNA en solución). Recuperada la fase acuosa se repite el tratamiento hasta no observar más la interface proteína (generalmente se suficiente realizar 2-3 desproteinizaciones).

Las trazas de feno, en la solución acuosa, son extraídas por dilución contra buffer Tris pH 8,3 en dos intercambios de 4 litros cada uno. La concentración final de RNA en la solución es medida por absorción de UV a 260 m μ .

ADAPTACIONES AL DIA DE PROTOPLASTOS

Materiales:

olio sintético TGA (TGA) como descrito en Revel R et al (1961)
 lisosoma de clara de huevo
 suero albúmina bovina Aseptico (SAB)
 solución de Versene al 4 % pH 7
 Buffer Tris 1 M pH 9
 caldo nutritivo "Sinsheimer" (CNS) como descrito en Orthado y
 Sinsheimer 1960

Métodos:

1) Preparación de protoplastos; El método usado es de Sinsheimer (1961) parcialmente modificado.

Una cultura de células, crecidas por la noche en TGA, es diluida x 50 en TGA fresco y hecha crecer hasta aproximadamente 5×10^8 células/ c.c.. Centrifugadas las bacterias se resuspenden, en un volumen del volumen inicial de TGA con 20 % de sacarosa. Se agrega buffer Tris pH 9 y solución de lisosoma al 1 % (1/20 del volumen, de cada uno). Despues de 3 min. a temperatura ambiente se agrega 1/25, en volumen, de buffer Versene. Despues de otros 10 min. se diluye, en 5 veces el volumen, en CNS con 0,1 % SO₄²⁻ y 2 % SAB, y se incuba por 5 min. a 37° para luego diluir nuevamente en 4 volúmenes de CNS con 0,1 % de SO₄²⁻. Finalizado este tratamiento se observa - al microscopio de contraste de fase - que más del 95 % de las células son protoplastizadas.

2) Infección de protoplastos;

Aliquots de protoplastos, preparados como está descrito, son inoculados con igual volumen de soluciones de RNA, en buffer Tris pH 6,3, por un min. a 37°, cuando luego diluido y sembrados con células iniciadoras (RfR).

Resultados:

Con el método descrito se obtiene una infectividad igual a aproximadamente 10^{-7} equivalentes fago de RNA. Calculado en base a la cantidad de RNA recuperado dividido por $2,5 \times 10^{-15}$ (cantidad de RNA por fago).

Igualos resultados se obtienen si se usa protoplastos de bacterias R-, R+ o RfR, demostrando (como evidenciado por Davis *et al.* 1961) que la selectividad de RfR a células normales es debida a propiedades de absorción.

Controles con células normales (a igual concentración de la usada con protoplastos) mostraron infectividad en una de las preparaciones de RNAs. Esto fue debido a que algunas partículas fágicas sobrevivieron al trato con fensol, y que según descritas más adelante. Para evitar este factor contaminante se centrifugó la solución de RNA en gradiante de CsCl a densidad 1,7, obteniendo que el RNA se concentrase en el fondo del tubo de centrifugación, mientras las partículas subfágicas (que conteniendo proteína demostraron mantener densidad similar al fago normal) se concentraron en la superficie del tubo. El RNA así purificado, perdió toda capacidad infectante a células normales.

separó de los controles tratando las colonias de RM
30 min. a 37° C. con RNase, lo que provocó la pérdida de la capa
celular infestante a protoplastos.

III.- PARTÍCULAS SUBVIRIALES

Como fue mencionado en el párrafo precedente, una de las preparaciones de RNA mostró infectividad a células normales.

Para excluir la posibilidad de la presencia de bacteriófagos enteros, se trató la preparación con RNasa (40 U/cc. por 30 min. a 37°) observándose la pérdida de dicha infectividad.

Excluyendo la posibilidad de que la infectividad observada fuese debida a bacteriófago λ normal (pues como se dijo en el capítulo I, este fago es resistente al tratamiento con RNasa) quedaban dos interpretaciones posibles para explicar el fenómeno, y eran: 1) que contrariamente a lo publicado y observado en otras preparaciones, el RNA de HBV pudiera ser infectivo a células no protoplastizadas, o 2) que se hubieran producido durante la extracción del suero vírico (y probablemente debido al ataque parcial del fenoil a la envoltura proteica del fago) partículas subfágicas que teniendo la envoltura proteica intacta, mantuvieran la capacidad infectiva pero se tornasen sensibles a la acción de la RNasa.

Para decidir entre estas dos alternativas, se hicieron las siguientes pruebas: a) gradiante de sacarosa, b) sueltamiento de C10e y c) Infección a células F-.

Si fuese cierta la primera alternativa, que el RNA de HBV podría infectar células normales, el factor infectante debería desplazarse en gradiante de sacarosa - conjuntamente con el RNA (determinado por la absorción de UV a 260 M μ) mientras si fuese cierta la segunda alternativa, la infectividad a células normales debería concentrarse en

el fondo del tubo, pues las partículas fágicas tiene mayor masa por volumen, y por lo tanto deben moverse más rápidamente en las condiciones de centrifugación usadas.

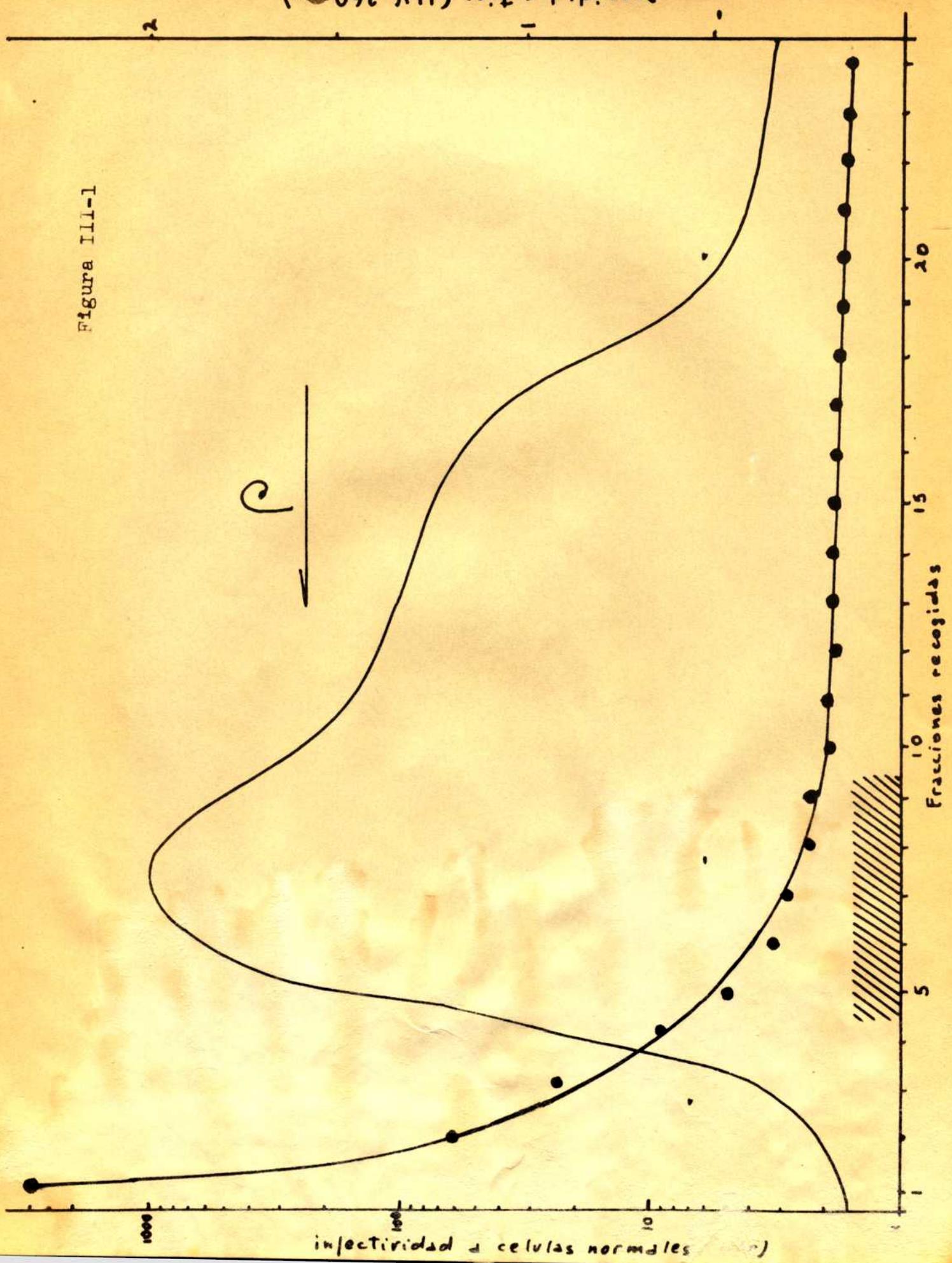
La figura III-1 muestra el resultado de un gradiente de sacarosa (de 20 al 4 %) centrifugado a 25.000 r.p.m. por 13 horas a 4°, en una Spinco L con rotor SW25. Del estudio de las 24 fracciones recogidas, se puede observar que la infectividad a protoplastos de células P- coincide con las fracciones de mayor densidad óptica (medida por absorción de UV a 260 m μ) correspondiente al RNA.

Con un gradiente de densidad al Cl₂Cu se puede distinguir si el factor infectante a células normales, es RNA aislado o en unión a proteínas, pues el RNA tiene densidad en Cl₂Cu mayor de 1,9, mientras el fago MS2 tiene densidad 1,46. Con la realización de una centrifugación a densidad 1,46 de Cl₂Cu, en centrífuga Spinco L con rotor SW 39 a 29.000 r.p.m. a 18° por 20 hrs., se observó - por medición de la densidad óptica de las fracciones recolectadas - que el RNA se hallaba concentrado en el fondo del tubo, mientras las partículas infectantes a células normales quedaron en equilibrio aproximadamente en la mitad del gradiente. La infectividad a protoplastos de células P- también se encontró en las primeras fracciones recolectadas.

Como ulterior prueba biológica, se ensayó la infectividad de estas partículas a células normales P- obteniendo resultados negativos.

En base a estos resultados, concluimos que en ciertas condiciones - difíciles de precisar - durante el tratamiento de los bacteriófagos MS2 con fenol, se tiene la formación de algunas partículas sub-

Figura III-1



ACT - +)

100% ~~sterile~~ 0
100% ~~sterile~~ 4

100% -

100% - Infectivity cultures
100% - BT

100% - ~~sterile~~ on ~~infectivity~~
100% ~~sterile~~ on ~~infectivity~~
100% ~~sterile~~ on ~~infectivity~~

En el caso de la fibrosis pulmonar, se observa una alteración de tipo tuberculoso, con formación de nódulos que se extienden por el pulmón, y que se caracterizan por tener una gran cantidad de células normales, conservando la estructura de los órganos pulmonares.

Inactivación del RNA de 232 por acción del H₂ de A_e

Métodos:

Los métodos empleados para el estudio de la inactivación del RNA de 232 han sido : 1) Una preparación a alto título de 232 (preparada como descripto en IIIa) tratada con 10 μ g/ml de H₂ de A_e se expone por 30' a la luz ininterrumpida y luego se extrae el sólido nucleico, con el método previamente descripto, tomándose precauciones de realizar el procedimiento al abrigo de la luz. 2) Soluciones en buffer tris pH 8,3 de RNA extraído de bacteriófago 232, con mezcladas con H₂ de A_e a varias concentraciones y luego de estabilizarlas por 24 horas a 4° C., son expuestas a la luz y a varios intervalos de tiempo se mide la infectividad a protoplastos.

En ambos métodos se ha usado protoplastos de bacteria P- y luego del período de absorción se los ha sometido con células indicadoras (Hfr 3000 o Hfr 4032).

Resultados:

Con el primer método, o sea la fotoinactivación por H₂ de A_e antes de extraer el sólido nucleico, se ha obtenido la total inactivación de la capacidad infectiva del RNA.

En la tabla III-1 se muestran los detalles del experimento.

Como se verá la infectividad de la suspensión inicial es aproximadamente el 2,6 % del equivalente fago medida por densidad óptica - esto es normal pues además de la inactivación inicial de los lisados (I-1) se

FIGURA 3. Sustido de infectividad durante el proceso de ampolleación.

Se observa mayor actividad de infectividad, en relación a otros procedimientos, en la cuenca del Co do al aumento de extracción total de nucleicos.

Con el seguimiento de la inactivación es radicalmente superior.

En la figura 4 se muestran la inactivación, resultado de dando otros niveles de almidones, e así tratado con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

de Co .

Tabla III-1

TABLA VIDA DEL RIA DE FAGE TRATADO CON H₂ DE A₀

	D_{20}/ml (a)	equivalente partículas fágicas/ml.	Unidades infectivas por ml.
suspensión fágica original (1)	30	$8,35 \times 10^{13}$	$3,2 \times 10^{12}$
suspensión fágica inactivada (2)	30	$8,35 \times 10^{13}$	< 10
RIA de fages no inactivados	31	$6,18 \times 10^{13}$	$7,6 \times 10^9$
RIA de fages inactivados	32	$5,35 \times 10^{13}$	< 10

(a) Transmisión óptica a 260 m⁻¹.(1) La suspensión fágica fue tratada con 10 µg/ml. de H₂ de A₀ y titulada al abrigo de la luz.

(2) Parte de la suspensión fágica que fue expuesta por 30 minutos a la luz inactivante.

La interpretación por nosotros dada, para explicar la diferencia entre la fotoinactivación del RNA "in vitro" y dentro del bacteriófago, es que en el segundo caso el ácido nucleico podría tener una estructura secundaria que rinda más eficiente el transferimiento de la energía de las moléculas del colorante al RNA. Las bases para dicha interpretación serán expuestas y discutidas más adelante.

La estabilización, por 24 horas a 4°, de los complejos RNA - N. de A., fuó realizada para obtener una mezcla uniforme entre el ácido nucleico y el colorante. No hemos investigado otras condiciones, pero no tenemos razón de suponer que los resultados hubieran sido alterados, en cuanto - en contraste con la situación en el bacteriófago donde la envol- tura protoica actúa como membrana semi-permeable - el ácido nucleico se encuentra en directo contacto con las moléculas de N. de A.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El bacteriófago M2, por nosotros elegido, se asemeja mucho al bacteriófago f2 analizado y descrito por Loeb y Binder (Loeb T., 1961; Loeb T. and M. Binder 1961 y Binder R., 1962), tanto por la composición del ácido nucleico - que en ambos casos es RNA - como por las características físicas - densidad y dimensiones -.

Ambos bacteriófagos atacan específicamente bacterias *E. coli* portadoras del factor sexual F y su ácido nucleico es infectivo a protoplasmas. (Joris et al., 1961).

tras características ocultas, por nosotros estudiadas, con el tio o de urina y la inactivación inicial del bacteriófago enjuagada después de la reducción de ligados. Sin embargo, en la sensibilidad a la acción de la RNase durante infección, pues M2 es relativamente resistente a este tratamiento (lo) mientras f2 es completamente inactivado por la presencia de 0,1 $\mu\text{g}/\text{cc}$. de RNase en el medio de infección, esto indicaría un diferente sistema de adhesión a las células, haciendo que el RNA durante infección sea - en el caso de M2 - menos accesible a la enzima presente en el medio.

Los estudios sobre el efecto fotodinárico del Barbiturato de Acrídina sobre M2 demuestran que este fago es altamente sensible al tratamiento, y que su inactivación es logarítmicamente proporcional al tiempo de exposición a la luz (a concentraciones constantes de colorante) en la primera parte de la curva, pero luego apartarse hacia menor sensibilidad cuando la inactivación es muy alta. Esto es posiblemente debido a la reactivación por multiplicación.

Cánd de inactivación en las ce ce de titulación.

No se han obtenido mutantes resistentes de λ a la acción fotodisociación lot. o de λ , aún a niveles de inactivación muy superiores a aquellos en los cuales se observan mutantes naturales.

La comparación de las curvas de inactivación (con iguales dosis de colorante) de T6 y λ , demuestra que este último es mucho más sensible al efecto fotodisociativo de λ de λ , posee a que sus dimensiones son excesivamente grandes - y por lo tanto su tamaño de tarja a la luz inactivante es proporcionalmente inferior -. Esto es interesante dado que ev. lonota que λ es inactivado con una sola lesión a su "codo" nucleico (que siendo RNA es a singula cadena) mientras T6 tiene RNA como doble nucleico, necesita más de una lesión para ser inactivado.

Para dar validez a la interpretación expuesta, es necesario a suponer que el colorante tenga la misma eficiencia de unión con el doble nucleico en ambos bacterifagos. En base a esta asunción, es posible hacer una comparación del efecto fotodisociativo de λ de λ , con el de deionamiento de P^{32} en bacterifagos con DNA a singula y a doble cadena.

Bessman (1957) observó que los bacterifagos λ 174 y λ 13 tienen una sensibilidad diez veces mayor, a la inactivación por deionamiento de P^{32} , de los otros colifagos conocidos. Esto se demostró de que ambos fagos tienen como material genético DNA a singula cadena (Kashhofer 1961 a y b). En base al modelo de que la lesión producida por el deionamiento de P^{32} es por ruptura de las uniones fosfato de cada sencilla cadena, es fácil visualizar la razón de la alta

encontrado en el Pb , TiO_2 y Al_2O_3 , tanto un lejón de rata como uno tipo de bacterio.

En el caso del lejón de rata, se influye el tamaño del bacterio más fuerte, en cuanto el efecto no es dependiente de factores externos. En el caso de la bacteriota-molde, el tamaño le trae tiene notable influencia, ya que vienen a las dimensiones del Pb en una tasa de 10^3 veces de las dimensiones lumínicas. Si se tiene en cuenta que el Pb tiene un diámetro de 24 nm en comparación a TiO_2 que tiene un diámetro de 65 nm se puede observar fácilmente la razón por la cual no se observan las diferencias mayor de 10^3 veces, pero el Al_2O_3 en HgCl_2 tiene dimensiones cercanas a ver futuramente para el Al_2O_3 en TiO_2 .

Este punto de similitud entre el efecto del lejón de rata y las bacterias fotolíticas del Pb con las observaciones de Treifeller et al. (1961) que determinaron que la lesión al DNA "in vivo" por el efecto fotolítico del Pb , se nota principalmente por ataque (cavación) a la doble cadena.

Al respecto del Pb se puede ver resumido (por ilustración) del bactericida, verificó que la unión del colorante con el ácido nucleico se da rápidamente.

La irreversibilidad de la sensibilidad a los UV de los bactericidas tratados con Pb de HgCl_2 , hace suponer que no hay mayor alteración estructural del ADN de acuerdo a HgCl_2 con las concentraciones de colorante existentes. La observación se realizó con TiO_2 .

El bactericidio HgCl_2 tiene como composición aproximadamente $2,5 \times 10^{-15} \text{ mg de } \text{Hg}$ y $5 \times 10^{-15} \text{ mg de proteínas por partícula}$ (Cobato

comunicación personal).

La extracción de un fondo nucleico se ha efectuado por tratamiento con fenol, pero pese a las precauciones tomadas para evitar la degradación del mismo, se ha observado en gradientes de sucrosa (una de las cuales puede observarse en la figura III -1) que el RNA es en gran parte destruido. Para explicar este fenómeno, lo más extravagante de los hipótesis es que el fondo nucleico degradado corresponde a los bacteriófagos que han perdido su capacidad infectiva.

La baja infectividad de las preparaciones del RNA a protoplastos puede ser debida a la degradación mencionada, pero es también posible que intervengan otros factores. Davis *et al.* (1961) al bien publicaron la infectividad del RNA de M22 a protoplastos, no mencionaron la infectividad con la cual lo realizaron.

Durante la extracción del fondo nucleico de M22, y probablemente debido a las precauciones tomadas para evitar la degradación del mismo, se obtuvieron partículas subvivas que se caracterizaban por mantener infectividad a células normales (Hep) y conservar similitud dimensional en gradiente de CsCl, pero adquirieron sensibilidad al tratamiento con RNase. Es probable que dichas partículas tienen sólo parcialmente lesionada la envoltura proteica, (por acción del fenol) habiendo accesible el fondo nucleico a la enzima esterasa, pero manteniendo la capacidad de absorción a la pared celular de bacterias *P*⁺ o *Hep*.

Al estudio de la fotoinactivación del RNA "la vaina", en comparación con R. de A., demostró que la pérdida de infectividad del mismo es muy inferior a la esperada en relación a la sensibilidad del bacteriófago a igual tratamiento.

Por ello hemos realizado la extracción del RNA luego de haber fotoinactivado el bacteriófago con 1μ de A_260 que mostró (Tabla III -1) que el ácido nucleico así tratado perdió toda capacidad infectante. Debido a la baja resolución del sistema de infección a protoplastos sólo podemos aseverar que la inactivación es de por lo menos 10^{-5} , aún así es muy superior a la observada por el tratamiento "in vivo".

La confirmación de estos resultados, por el estudio de las posibles rupturas en la molécula del RNA en gradiente de sacarosa, no ha sido realizada en cuanto (como se dijo previamente) los preparados del ácido nucleico extruido de MS2 de por sí presentan un alto porcentaje de moléculas fragmentadas, y ésto hace inadecuada la comparación de las curvas.

Tenemos el propósito de realizar -en el futuro- un tentativo de marcar con sustancias radioactivas (P^{32}) el RNA de MS2, y luego realizar la fotoinactivación por diversos tiempos de exposición a la luz. Extraer el RNA y desolarlo con un exceso de RNA no marcado, para luego estudiar el efecto degradante por comparación de la distribución de la radioactividad en la curva de densidad óptica de los gradientes de sacarosa. Confiamos que este sistema nos permita obtener la información deseada pues esperamos encontrar una ampliada de distribución, de la radioactividad en el gradiente, proporcional con la inactivación.

Esto confirmaría la hipótesis de que la inactivación es debida a la ruptura de la molécula de RNA.

Otro mecanismo podría ser también responsable de la inactivación, por ejemplo: la formación de enzachamientos cruzados o la combinación del RNA con la proteína de la envoltura proteica por medio de uniones de hidrógeno.

Muchas razones pue en darse para explicar la diferencia de efectividad entre la fotoinactivación del RNA "en falso" y dentro del bacteriófago.

Las hipótesis más plausibles son 1) que el efecto fotodinámico se ejerce también sobre las proteínas del fago, 2) que pudiera estar presente -dentro del fago- alguna otra substancia que haga más efectivo el transporte de energía de las moléculas de N. de A. al RNA, y 3) que el RNA esté empaquetado, dentro del bacteriófago, en forma de tener una estructura secundaria que haga más fácil la inserción entre las bases de las moléculas de N. de A., y por lo tanto más eficiente el transporte de la energía inactivante.

La primera de las hipótesis tiene como contradicción el hecho que es conocida la alta eficiencia de los colorantes de cianina para los ácidos nucleicos, mientras no se conoce ningún efecto de los mismos sobre las proteínas. Además el hecho que el ácido nucleico extraído de R.2 fotoinactivado, no recobre actividad infectiva, hace suponer - si existe - que el efecto sobre las proteínas debe ser pequeño en comparación al efecto sobre el RNA.

La posibilidad de la presencia de alguna substancia dentro del bacteriófago, no es de fácil exclusión, pero la falta de precedentes en este sentido nos la hace muy improbable.

En sustentamiento de la tercera hipótesis están los estudios de polarización de la luz (Bandet *et al.*, 1960) y difracción de los rayos X (Morton y Rich, 1961) de los bacteriófagos T4, según cuyos resulta-

dos se determinó que la molécula de DNA está ordenadamente empaquetada dentro de la envoltura proteica. Esto produce un casi continuo paralelismo de las hélices consigo misma.

Si el DNA dentro de M32 tiene - como es probable - un ordenamiento rígido, implicaría el apareamiento de la cadena del DNA - consigo misma - en una estructura de tipo secundario. Una configuración similar haría más fácil la inserción de las moléculas de R. de A. entre las bases, acercándose al modelo de agregación del R. de A. con el DNA propuesto por Lerman (1961), y en consecuencia el transferimiento de la energía inactivante sería más efectiva.

Por otra parte Reifelder y colaboradores (1961) demostraron que efectos químicos secundarios pueden intervenir en la degradación del DNA tratado "in vitro" con R. de A. Si la ausencia de una estructura secundaria implica que el R. de A. no se une firmemente con el DNA cuando éste se halla libre en solución, un efecto físico residual y la acción química del colorante sobre las bases purínicas y pirimidínicas como sobre los ribosomas, podrían justificar la baja pérdida de infectividad observada en los experimentos de foto-inactivación "in vitro".

Si bien no podemos definirnos categoríicamente sobre la estructura de los complejos del DNA de M32 con el R. de A., creemos tener suficiente información para sostener que el efecto fotodinámico del colorante se notará principalmente - si no exclusivamente - sobre el ácido nucleico del bacteriófago M32.

B I B L I O G R A P H Y

Adams M. L., 1955 - Method of study of bacterial viruses,
in Methods in Medical Research Vol 2. Year Book
Publishers, Chicago USA.

Berriet J. J., Goldstein B. and Israeff N. A. 1960
Nature 187, 732.

Bertani L., 1951 - Studies on Lysogeny. I. The mode of
phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 62, 293-300.

Blum H. F., 1941 - Photodynamic action and diseases caused
by light. Reinhold Publishing Co. New York USA.

Brady D. P. and Wolf N. E., 1959 - Aggregation of Ions
bound to Polyanions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45, 944-952.

_____, 1960 - Neurochemistry of
Polymelectrodes. In Neurochemistry of Neurlectides
and amino acids. Brady and Tower editors. J. Wiley
and Sons Inc. USA.

Brenner S., Benser S. and Barnett L., 1958 - Distribution
of Proflavine-induced mutations in the genetic fine
structure. *Nature* 182, 983-985.

_____, Barnett L., Chick P. H. G. and Ongel L., 1961 -
The Theory of Mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 3, 121

- Alfton G., 1931 - Photodynamic action of certain dyes
on the inactivation of *staphylococcus* bacteriophage.
Proc. Soc. Appl. Biol. 20, 743-746.
- Brick L.L., Barnett L., Brenner S., and Pattle-Tobin R.J.,
1961 - General nature of the genetic code for proteins.
Nature 192, 1227-1232.
- Burster A. and Colnick J.L., 1961 - The incorporation
of natural red and horidine orange into developing
poliovirus particles making them photosensitive,
Virology 14, 11-12
- Cava J., and Winsboomer G., 1961 - Bacteriophage
λ2: Another RNA phage. *Science* 134, 1427
- De Are R., 1953 - Chemical mutagenesis in bacteriophage
T2. *Nature* 172, 964.
- De Are R., Uriel M., Fischer R., and Levinthal C.,
1953 - The production of incomplete bacteriophage
particles by the action of proflavine and the prop-
erties of the incomplete particles. *Ann. Inst.*
Anticour 84, 113
- Sphrusse A. 1950 - Induction par l'acriflavine d'une
mutation spécifique chez la levure. *Publ. Acad. Roy.*
22, suppl 1
- Troifordor A. 1959 - Ph.D. Thesis, University of Chicago.
- Troifordor A., Javakishvili R.F., and Goldmacher R.P. 1961 -

- range by visible light to the Acridine range -
DNA complex. Biophysical J. 1, 399-400
- Fraifeldor L. and Breit A. 1960 - Inactivation by
visible light of yeast sensitized by a malic acid
fluorochrome. Nature 186, 731-732
- Guthrie G. L. and Sinsheimer R. L. 1960 - Infection
of protoplast of Aspergillus cell by subviral
particles of bacteriophage phi 174 - J. Mol. Biol. 2, 297-305
- Hirata Y. 1956 - Artificial elimination of the F factor
in *Esch. coli* K 12. Nature 176, 92
- Hirata Y. 1960 - The effect of acridine dyes on mating
type factors in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 46,
57-64
- Hirata Y. and Miyazaki T. 1957 - Acriflavine as an effective
for eliminating F factors in *Escherichia coli*.
Nature 180, 655
- Hirata Y. and Mizutani H. 1961 - F^r and F mediated
transduction in *E. coli* K 12. Japan J. Genetics 36, 307
- Larsen L. 1961 - Structural considerations in the inter-
action of DNA and Acridines. J. Mol. Biol. 3, 18
- Loeb L. 1960 - Isolation of bacteriophages specific for
the F and Mfr. Mating types of *Escherichia coli*
K 12. Science 131, 932-933.

- Knob T., and Minder R. 1961 - A bacteriophage containing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 590-593.
- Krauer H.A., and Brown A.R. 1961 - Studies on the Acridine Orange staining of two purified RNA viruses: Polio-virus and Tobacco mosaic virus. Virology 14, 74-82.
- Krauer H.A., and Hill W. C. 1961 - Acridine orange staining of a single-stranded DNA bacteriophage. Virology 14, 264-266.
- Lorthland J. C., de Bruyne P. P. B., and Smith A. E. 1954 - Spectrophotometric studies on the interaction of nucleic acids with arachidonic acid and other basic dyes. Proc. National Cell Congress 1, 201.
- North A. G. F. and Finch A. 1961 - A-ray diffraction studies of bacterial viruses - Nature 191, 1243-1245.
- Orgel L., and Brenner S. 1961 - Degradation of bacteriophage T4 by acridine. J. Mol. Biol. 3, 769-783.
- Pedron, J. A., and Todd, C., 1933 - The photodynamic action of methylene blue on bacteriophages. Proc. Roy. Soc. (London) A12, 277-287.
- Quadrive J. J. and Margaritis L. L. 1960 - Bacteriophotometric studies on the binding of acridine orange to ribonucleic acid deoxyribonucleic acid. Biochim. Biophys. Acta 52, 547-550.

FCVWA

Kevell H., Ariz. J. and Rotman S. 1961 - Biosynthesis
of β -D-galactosidase controlled by phage carried
genes. ... Induced β -D-galactosidase biosynthesis
after transduction of gene z by phage. Proc. Natl.
Acad. Sci. 47, 1956-1967.

Wimberger et al. 1959a - A single-stranded deoxyribonucleic
acid from bacteriophage SL174. J. Mol. Biol. 1, 37-42.

Reassam . 1958 - The unusually high sensitivity of
bacteriophage SL174 and 313 to P32 decay -
Program and Abstracts. The Biophysical Society p42

Welch J. . and Adams R.H. 1954 - Photodynamic inactivation
of bacteriophage. J. Bacteriol. 69, 123-127

Yanamoto . 1958 - Photodynamic inactivation of bacterio-
phage inhibition. J. Bacteriol. 72, 443-448

Zinder S 1962 - on Perspectives in Virology Vol.3 (in publication)

??
J. Amathi