



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
IZTACALA**

**REPRESION CATABOLICA DE LA ACTIVIDAD  
DE LA ENTEROTOXINA ST DE  
Escherichia coli**

**T E S I S**

**Que para obtener el Título de**

**B I O L O G O**

**p r e s e n t a**

**LUZ MARIA GUZMAN VERDUZCO**

**México, D. F.**

**1986**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A LA MEMORIA DE MI PADRE Y A MI MADRE, LUIS Y LUZ MARIA.

A MIS HERMANOS: LUIS, XAVIER, ARMANDO, JORGE, GUILLERMO  
Y LUZ ELENA

A JAIME

A LA DRA. ROSA MARIA VERDUZCO BARBOSA

A MIS MAESTROS

A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO 12, A HEATHER

A ROCIO, Y A JESUS

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Jacobo Kupersztch Portnoy, a quien hago patente mi mas sincero agradecimiento por su valiosa asesoria, y por su continua motivación para la búsqueda y formación científicas.

Durante el desarrollo de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. A esta institución hago patente mi agradecimiento.

## INDICE

	Página
ABREVIATURAS .....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi

## INTRODUCCION

1.- Enterotoxinas	
a) Definición, clasificación y modo de acción.....	1
2.- Enterotoxina ST	
a) Estabilidad.....	2
b) Peso molecular y estructura.....	2
c) Detección e inmunogenicidad.....	3
d) Secreción.....	4
3.- Plásmidos	
A. Algunas propiedades genéticas de los plásmidos	
a) Clasificación. Transferibilidad y compatibilidad.....	5
b) Número de copias.....	7
B. Plásmidos ST.....	8
C. Estructura y aislamiento.....	9
4.- El promotor e iniciación de la transcripción.....	10
a) Control positivo de la iniciación.....	12
5.- Represión Catabólica	
a) Efecto de glucosa.....	13
b) Mutantes cya y crp.....	14
c) Mecansimo.....	14

	Página
6.- Estudios preliminares sobre la represión catabólica de la actividad de ST.....	17
7.- Objetivo.....	22

#### MATERIALES Y METODOS

1.- Cepas bacterianas y plásmidos.....	24
2.- Medios de cultivo.....	24
3.- Amortiguadores.....	26
4.- Líquidos de centelleo.....	26
5.- Aislamiento de plásmidos por el minimétodo de ni- trocelulosa.....	27
6.- Electroforesis en geles de agarosa.....	28
7.- Tratamiento de muestras radiactivas en papel y condiciones de conteo.....	28
8.- Cinética de incorporación de <sup>3</sup> H-timina.....	29
9.- Marcaje de cultivos con <sup>3</sup> H-timidina.....	30
10.- Marcaje de cultivos con <sup>14</sup> C-timina.....	30
11.- Lisados crudos y gradientes analíticos de CsCl- EtBr para la determinación del número de copias....	31
12.- Determinación del complejo de relajación en gra- dientes analíticos de velocidad de sedimentación...	32
13.- Gradientes preparativos de CsCl-EtBr y de sacarosa.	33
14.- Colección de fracciones de gradientes.....	34
15.- Concentración de muestras provenientes de gra- dientes preparativos de CsCl-EtBr.....	35
16.- Aislamiento de pYK007 por el método de nitrocelu- lusa.....	35
17.- Inmovilización de DNA en filtros de nitrocelulosa..	37
18.- Hibridización de DNA.....	37
19.- Ensayo biológico para la detección de ST y sonica- ción.....	39
20.- Determinación de la concentración de DNA y de pro- teína.....	40
21.- Reactivos.....	42

I. EFECTO DE LAS DELECCIONES EN <i>cya</i> y <i>crp</i> SOBRE EL NUMERO DE COPIAS DEL PLASMIDO pYK007.	
1) Determinación del número de copias de pYK007 mediante el empleo de gradientes de CsCl-EtBr.	
i) Comprobación de la presencia del pYK007 en la cepa silvestre y las mutantes deficientes en represión catabólica, en gel de agarosa.....	43
ii) Determinación del Peso Molecular de pYK007 y pYK008.....	46
iii) Cinética de incorporación de 3H-timina en presencia de deoxiadenosina a cultivos en fase exponencial.....	51
iv) Estimación del porcentaje de DNA superhelicoidal.....	53
v) Numero de copias de pYK007 y pYK008 por equivalente genómico.....	56
vi) Complejo de relajación de pYK007 y determinación de un plásmido críptico en las cepas en estudio.....	58
2) Determinación del número de copias de pYK007 por hibridización.	
i) Comprobación de la presencia del pYK007 como único plásmido en la cepa 7A-35.....	63
ii) Eficiencia y linealidad de la inmovilización de DNA a filtros de nitrocelulosa.....	64
iii) Eficiencia de hibridización.....	66
iv) Hibridización de lisados crudos de las cepas silvestre, <i>cya</i> y <i>cya crp</i> contra DNA de pYK007 inmovilizados en filtros de nitrocelulosa.....	69
II. EFECTO DE LA MUTACIONES <i>cya</i> <sup>Δ</sup> y <i>crp</i> <sup>Δ</sup> SOBRE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LA TOXINA ST.	
1) Cuantificación de la ruptura celular por sonicación...	76
2) Efecto de la sonicación sobre la actividad de ST.....	78
3) Determinación de la actividad intracelular de ST en sonicados de las cepas en estudio.....	78

	Página
4) Efecto del calentamiento sobre la actividad intracelular de ST en las cepas silvestre, $cya^{\Delta}$ y $crp^{\Delta}$ .....	80
DISCUSION.....	84
APENDICE.....	96
REFERENCIAS.....	104

### ABREVIATURAS

AMPC	Monofosfato 3', 5' cíclico de adenosina
Ap	Ampicilina
CCC	Circular y covalentemente cerrado
cpm	Cuentas por minuto
crp	Gene que codifica para la proteína receptora de AMPC
CRP	Proteína receptora de AMPC
CsCl	Cloruro de cesio
cya	Gene que codifica para adenilato ciclasa
DABA	Acido diaminobenzoico
dal	daltones
dpm	Desintegraciones por minuto
DNA	Acido desoxirribonucléico
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EtBr	Bromuro de Etidio
GMPC	Monofosfato 3', 5' cíclico de guanosina
IPTG	Isopropil tio $\beta$ -galactósido
leu	Leucina
LT	Lábil a la temperatura
Md	Megadaltones
met	Metionina
Nal <sup>r</sup>	Resistente a ácido nalidíxico
nm	Nanómetros
O.D.	Densidad óptica
PI	Bacteriófago PI
P.M.	Peso Molecular
PPO	2' 5' difeniloxazol
pro	Prolina
r	Resistencia

RNA	Acido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
RNAsa	Ribonucleasa
s	sensible
SDS	Dodecilo sulfato de sodio
Sm <sup>r</sup>	Resistente a estreptomicina
ST	Estable a la temperatura
Tc <sup>r</sup>	Resistente a tetraciclina
TCA	Acido tricloroacético
thi	Tiamina
thr	Treonina
thy	Timina
Tra	Genes de transferencia
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
U.K.	Unidades Klett
U.V.	Luz ultravioleta

## INDICE DE FIGURAS.

	Página
FIGURA 1. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la enterotoxina ST de <u>E. coli</u> .....	1
FIGURA 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de lisados tratados con nitrocelulosa, de las cepas en estudio con pYK007 o pYK008.....	45
FIGURA 3. Electroforesis en gel de agarosa de lisados de la cepa 78-IEC, y de cepas con plásmidos marcadores de peso molecular.....	48
FIGURA 4. Curva de calibración de peso molecular para los plásmidos de la cepa 78-IEC.....	49
FIGURA 5. Curva de calibración de peso molecular para los plásmidos pYK007 y pYK008.....	50
FIGURA 6. Cinética de incorporación de <sup>3</sup> H-timina a cultivos en fase exponencial en presencia de deoxiadenosina.....	52
FIGURA 7. Perfiles de gradientes de CsCl-EtBr de lisados de las cepas empleadas en la cuantificación de DNA superhelicoidal de pYK007.....	55
FIGURA 8. Análisis del complejo de relajación de pYK007 en gradientes de velocidad de sedimentación.....	60
FIGURA 9. Análisis del perfil de DNA de las cepas silvestres, cya <sup>Δ</sup> , y crp <sup>Δ</sup> , sin pYK007 en gradientes de CsCl-EtBr..	62

	Página
FIGURA 10.	
Análisis de el DNA superhelicoidal de la cepa 7A-35 en gradientes de velocidad de sedimentación.....	65
FIGURA 11.	
Linearidad de la inmovilización de DNA a filtros de nitrocelulosa.....	67
FIGURA 12.	
Eficiencia de la hibridización DNA-DNA.....	70
FIGURA 13.	
Eficiencia de la ruptura celular por sonicación.....	76
FIGURA 14.	
Familia de curvas de corrección de quencheo para $^{14}\text{C}$ .	100
FIGURA 15.	
Familia de curvas de corrección de quencheo para $^3\text{H}$ .	102

## INDICE DE TABLAS.

	Página
TABLA 1.	
Efecto del AMPc sobre la actividad toxigénica de ST...	19
TABLA 2.	
Efecto de $cya^{\Delta}$ y $crp^{\Delta}$ sobre la estabilidad de la frecuencia de transferencia y sobre la integridad de pYK007.....	21
TABLA 3.	
Cepas bacterianas y plásmidos.....	25
TABLA 4.	
Efecto de las mutaciones $cya^{\Delta}$ y $crp^{\Delta}$ sobre el número de copias de pYK007, determinado por gradientes de CsCl-EtBr.....	57
TABLA 5.	
Comparación de la hibridización del DNA cromosómico y del plásmido críptico, contra el DNA de pYK007.....	72
TABLA 6.	
Efecto de las deleciones en $cya^{\Delta}$ y $crp^{\Delta}$ sobre el número de copias de pYK007 determinado por hibridización.....	74
TABLA 7.	
Efecto de la sonicación sobre la actividad de la enterotoxina ST extracelular.....	79
TABLA 8.	
Actividad de la enterotoxina ST intracelular y extracelular en las cepas silvestre y las mutantes $cya^{\Delta}$ y $crp^{\Delta}$ .....	81
TABLA 9.	
Efecto del calentamiento de extractos sonicados sobre la actividad de ST.....	83

## RESUMEN

Estudios preliminares mostraron que la actividad de la enterotoxina ST de E. coli se encuentra regulada por represión catabólica (80); la actividad de ST está abatida 100 veces, con respecto a la cepa silvestre, en cepas deficientes en adenilato ciclasa ( $cya^{\Delta}$ ), o que carecen de la proteína que se une a AMPc ( $crp^{\Delta}$ ).

En este trabajo se investigó el efecto de las mutaciones  $cya^{\Delta}$  y  $crp^{\Delta}$  sobre el número de copias del plásmido pYK007 ( $ST^+ Ap^r$ ), y sobre la secreción de la toxina intracelular.

Se determinó que el número de copias por equivalente genómico de el plásmido pYK007 en las cepas silvestre y las mutantes es de 1 a 2; el aumento en número de copias de pYK007 en la cepa silvestre con respecto a la mutante  $crp^{\Delta}$  fué de 1.24 veces.

En extractos sonicados y sobrenadantes de cultivos de las cepas  $cya^{\Delta}$  y  $crp^{\Delta}$  se detectaron niveles muy bajos de actividad tóxigena, en condiciones en las que la cepa silvestre mostró 100 veces mas actividad extracelular. Cuando los sonicados de la cepa silvestre fueron incubados a  $65^{\circ}C$  por 30 min, se encontró un aumento de 64 veces en los niveles de ST, mientras que los sonicados de las cepas deficientes en represión catabólica no mostraron este efecto de termoactivación.

Estos datos indican, que el efecto del complejo AMPc-proteína receptora del AMPc sobre la actividad de ST, no pueden explicarse como consecuencia de un cambio en el número de copias por equivalente genómico del plásmido pYK007, o por una alteración en la secreción de ST que resulte en la acumulación de la toxina intracelular activa o de toxina termoactivable. Los resultados obtenidos son compatibles con la hipótesis de que la síntesis de la enterotoxina ST se encuentra regulada por represión catabólica a nivel de la transcripción del gene que codifica ST.

## INTRODUCCION.

## 1.- ENTEROTOXINAS.

## a) Definición, clasificación y modo de acción.

Las enterotoxinas bacterianas son proteínas que tienen un efecto tóxico en el tracto gastrointestinal de animales y humanos (10). Las manifestaciones clínicas más prominentes de enterotoxicidad son diarrea y vómito, causando desde daños ligeros, hasta letales. Las enterotoxinas varían en su modo de acción, pero se les puede clasificar en dos grupos generales: en el primero se encuentran las enterotoxinas citotóxicas, las cuales típicamente matan células eucarióticas (por inhibición de la síntesis de proteínas) (10); éstas son producidas por patógenos invasores (E. coli, Salmonella, Shigella, Yersenia enterocolitica, etc.) los cuales provocan la destrucción de la mucosa intestinal, aparición de fiebre, y otros síntomas sistémicos (104). El segundo grupo, integrado por las enterotoxinas citotónicas, alteran el metabolismo celular de manera específica (por ejemplo, por la elevación de nucleótidos cíclicos) (10) y son producidas por patógenos no invasores (Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Vibrio cholerae) con los cuales se presenta diarrea sin provocar cambios histopatológicos en el intestino o fiebre (104).

Las cepas enterotoxigénicas no invasoras de E. coli, pueden producir dos tipos de toxinas: enterotoxinas LT (sensibles al calor) y enterotoxinas ST (resistentes al calor). Con relación a este último grupo, se han reportado dos tipos (17): las enterotoxinas STA son solubles en metanol, activas en ratones lactantes e inactivas en puercos neonatales, mientras que las STB, son insolubles en metanol, activas en asa ileal de conejo y puercos neonatales, e inactivas en ratones lactantes. Las enterotoxinas LT y ST, estimulan la producción de adenilato ciclasa y guanilato ciclasa respectivamente, en las células blanco del intestino, ocasionando un incremento en los niveles celulares de AMPc en el caso de LT (23,30)

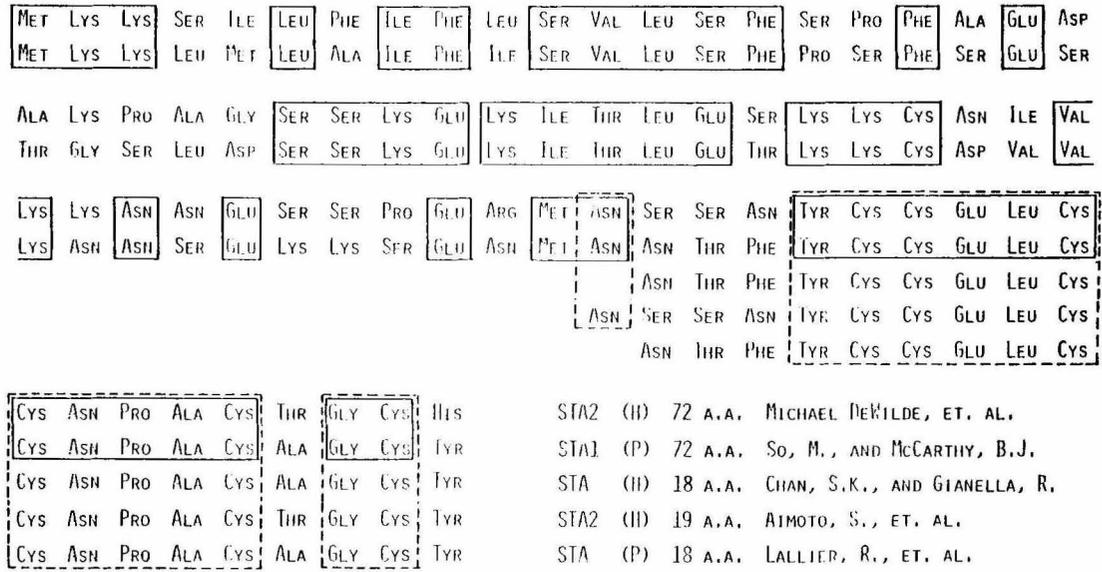


FIGURA 1. Comparación de la secuencia de aminoácidos de diversas enterotoxinas ST.

La secuencia de las dos especies de 72 aminoácidos fue inferida a partir de la secuencia nucleotídica de dos genes ST, mientras que la secuencia de las últimas tres toxinas, fue derivada de las ST extracelulares purificadas. Las regiones de homología de los péptidos extracelulares (forma madura) se encuentran encerradas entre líneas punteadas, y las presentes en las moléculas inferidas (precursor) se señalan entre líneas continuas. Las letras H y P se refieren al origen humano o porcino del gene o péptido ST.

y GMPc en el de ST (39,44), que a su vez resultan en la secreción activa de iones a la luz intestinal con la consiguiente pérdida de fluido característica de la diarrea (87). El mecanismo de acción de STB no se conoce, pero aparentemente no estimula un aumento de AMPc o GMPc (63).

## 2.- ENTEROTOXINA ST.<sup>1</sup>

### a) Estabilidad.

ST es estable al calor [resiste incubaciones a 100°C por un período de 15 a 30 min (17,58,61)], en varios solventes orgánicos [acetona, cloroformo, metanol (104)], y resistente a tratamientos con ácido y álcali [pH 1-9 (61,69)], proteasas, fosfolipasas, amilasas, desoxirribonucleasas y ribonucleasas (58,61).

### b) Peso Molecular y Estructura.

Se han purificado varias toxinas ST extracelulares procedentes de diversas cepas y orígenes (humano, porcino, etc), las cuales han observado pesos moleculares de 1,972 dal a 7,000 dal (2, 4,68,70,120). Así también, se ha determinado la secuencia de aminoácidos de algunas ST extracelulares (21,126,2,68,122), y la secuencia nucleotídica de varios genes que codifican para dicha toxina (87a,116,32).

En la figura 1 se presenta una comparación de la secuencia de aminoácidos de diversas enterotoxinas ST; las dos primeras (de 72 a.a.) fueron inferidas de secuencias nucleotídicas, y las tres últimas se obtuvieron de la secuenciación de aminoácidos de toxinas extracelulares purificadas. Es notable que en todas las enterotoxinas el extremo COOH-terminal de 18 a 19 aminoácidos (ST extracelular) está muy conservado (líneas punteadas), exhibiendo seis medias cisteínas con una distribución idéntica entre otros resi-

---

<sup>1</sup>A partir de esta sección y através del resto del texto, la enterotoxina STA está designada solamente como ST

duos homólogos; de esta región conservada solo 13 aminoácidos (de la primera a la última cisteína de las secuencias entre líneas punteadas) son requeridos para observar actividad biológica (123).

Varios investigadores han identificado una misma toxina en organismos de diferentes especies (70,87). Rao y Col. (101), compararon tres enterotoxinas ST con diferente composición de aminoácidos y peso molecular en relación a su acción biológica, su efecto sobre el transporte de iones y la actividad de guanilato ciclasa, encontrando que los mecanismos de acción y la potencia de los mismos son iguales para las tres toxinas; concluyeron, que la heterogeneidad en tamaño y composición de las diferentes ST's no se reflejan en diferencias en potencias o modos de acción.

#### c) Detección e inmunogenicidad.

Clásicamente la identificación de ST se ha basado en la producción de diarrea inyectando intragástricamente a ratones lactantes, requiriéndose como mínimo de 0.4 a 2.6 ng. de toxina (de 4.0 a 26.0 ng/ml) para observar una respuesta positiva (4). Actualmente, se han desarrollado métodos de detección mas sensibles, como son radioinmunoensayos (45,41) y un Ensayo de Inmoadsobente Ligado a Enzima (ELISA) (72), cuyos límites de detección son de 0.1 a 1.0 ng/ml (45), y de 0.133 ng/ml (72). En estos ensayos, se prepararon y emplearon anticuerpos contra ST acoplada a diversos acarreadores [inmunoglobulina G bovina (45), albúmina de suero bovina o hemocianina (41), albúmina de suero humana (72)], ya que la enterotoxina pura resulta ser pobremente antigénica (4). Una variedad de enterotoxinas ST fueron analizadas por radioinmunoensayo (45), mostrando reactividad cruzada con el anticuerpo obtenido a partir de una especie pura, mientras que en determinaciones con ST oxidada con ácido perbórmico, STB, LT, toxina de cólera, y otras proteínas, no se observó reactividad alguna. De el hecho de que la oxidación de ST suprimió completamente la reacción inmune así como la actividad biológica, y de la reactividad cruzada demostrada en STA's de diferente origen, composición y peso molecular, se infirió (45) que la región que contiene a las seis

medias cisteínas altamente conservadas (secuencias entre líneas punteadas en la figura 1), constituye un inmunodeterminante común para una familia de moléculas de ST, el cual estaría relacionado con el sitio activo, también común, y que probablemente requiere de uno o más puentes disulfuro.

d) Secreción.

La envoltura celular de E. coli está constituida por una membrana interna, el espacio periplásmico, una capa de péptido glicano y una membrana externa (26). Esta compleja estructura debe ser atravesada por la enterotoxina ST durante su exportación al medio de cultivo (112); ST es uno de los pocos productos secretados hasta el medio externo por E. coli.

La mayoría de las proteínas secretables, son inicialmente sintetizadas como precursores en ribosomas unidos a membrana, conteniendo un péptido extra en el extremo amino terminal (secuencia señal o péptido señal), que es removido proteolíticamente durante o después de la exportación, originando un producto maduro (84).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de péptidos señal en procariontes, muestra que estas secuencias de 18 a 25 aminoácidos, poseen muy poca homología en cuanto a estructura primaria, no obstante, con respecto a la polaridad hay similitud: el extremo NH<sub>2</sub>-terminal contiene de 2 a 8 aminoácidos cargados positivamente, que se continúan con un segmento de aminoácidos hidrofóbicos hasta llegar al sitio de procesamiento (84).

El mecanismo de exportación de ST se desconoce; en base a sus secuencias nucleotídicas y de aminoácidos (figura 1) se ha sugerido que: el hecho de que las toxinas extracelulares contienen de 18 a 19 aminoácidos mientras que los péptidos inferidos de secuencias de nucleótidos presentan 72 aminoácidos, implica que ST sufre un extenso procesamiento durante su exportación (10), por otro lado, el extremo NH<sub>2</sub>-terminal de los péptidos de 72 aminoácidos que representarían al precursor de ST, es consistente con los requerimientos del péptido señal (32). Datos experimentales acerca del precursor y procesamiento de ST fueron reportados por Lathe y Col. (70), quienes expresaron un gen de ST de origen porcino empleando

un sistema transcripción y traducción in vitro ; la fluorografía de los productos de traducción inmunoprecipitados con anti-ST y sometidos a electroforesis, revelaron la presencia de dos proteínas, una de 7,000 dal y otra de 10,000 dal de peso molecular, lo que sugirió que estos dos péptidos representan las formas procesada (madura) y no procesada (precursor) de ST (70).

### 3.- PLASMIDOS.

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos dispensables para la célula huésped, capaces de replicarse autónomamente (60). El rango de manifestaciones fenotípicas que expresan los plásmidos, es muy variada, encontrándose que pueden codificar para resistencia a antibióticos, factor sexual, resistencia a metales, colicinas, toxinas, factores de colonización, etc., de hecho existen un buen número de plásmidos, cuyo fenotipo es indeterminado; a éstos se les ha denominado, cripticos (27,47,106,111,118).

#### A. PROPIEDADES GENÉTICAS DE LOS PLASMIDOS.

##### a) Clasificación. Transferibilidad y compatibilidad.

Los plásmidos pueden clasificarse como autotransferibles o conjugativos (con características sexuales) y no autotransferibles (no conjugativos); los primeros son mayores de 30 kb (138) y tienen la capacidad de llevar a cabo su propia transferencia durante la conjugación, proceso de intercambio genético entre bacterias que depende de contacto celular y en el cual el material genético es transferido de un organismo donador, a uno receptor (139). El segundo grupo (no conjugativos) está integrado por plásmidos menores de 10 Kb, que son incapaces de promover su propia transferencia por conjugación, pero pueden movilizarse por la mediación de un plásmido conjugativo (138).

El plásmido F (factor sexual), fué el primer plásmido descrito, y pertenece a los conjugativos; se transfiere en un 100% a bacterias F<sup>-</sup> movilizándolo con muy baja eficiencia al cromosoma bacteriano (71), y puede integrarse al cromosoma bacteriano dando

lugar a bacterias Hfr, las cuales transfieren orientadamente marcadores cromosómicos a alta frecuencia como consecuencia de dicha integración (55). Cuando F se escinde del cromosoma, la bacteria Hfr revierte a F<sup>+</sup> siendo éste indistinguible del original, o alternativamente, se pueden generar factores que portan información cromosómica, denominados F' (55).

Dentro de los plásmidos no autotransferibles, ColE1 ha sido el más estudiado; éste al igual que todos los plásmidos no conjugativos, cuando se encuentra en presencia de un plásmido conjugativo particular en el mismo huésped puede mobilizarse (exhibiendo un fenotipo Mob<sup>+</sup>), para lo cual requiere de varias proteínas codificadas por el plásmido, las proteínas de movilización, y la presencia de una región de DNA en la molécula misma del plásmido, denominada hom (bases de la movilidad) (40); contenido en hom se encuentra un sitio (nic) en el cual se puede introducir un corte específico en el DNA por las proteínas que componen el complejo de relajación del plásmido (40).

La lisis con detergentes no iónicos de células que hospedan plásmidos, ha permitido el aislamiento de un complejo de relajación, que consiste en DNA de plásmido superhelicoidal asociado a proteínas que pueden introducir un corte en una de las cadenas del plásmido, cuando son tratadas con detergentes iónicos, proteasas o bromuro de etidio (66). En el caso del complejo de relajación de ColE1, se ha demostrado que el DNA está asociado a tres proteínas (66 Kd, 16 Kd y 11 Kd), y que al menos una de ellas (16 Kd) está codificada por un gene mob del plásmido (139). El corte en el DNA que provoca la relajación de ColE1, es específico para la cadena y para el sitio nic (73,74,136); una vez relajado el plásmido, la proteína 60 Kd se une covalentemente al término 5' del corte y las otras dos proteínas se disocian, lo cual puede preceder al inicio de la transferencia conjugacional del DNA a la célula receptora (139).

Otros plásmidos no conjugativos como son ColE2, pSC101, y RSF 1010 y los conjugativos F, R12, RK2, y R6K, poseen complejos de relajación, con especificidad de cadena o de sitio, o ambas (139).

Los plásmidos ColIb-P9 y R64 han sido aislados como complejos de relajación, pero no se ha demostrado que el corte se lleve a cabo en una cadena o sitio específicos (67).

Los plásmidos también pueden clasificarse en grupos de incompatibilidad, los cuales se basan en el hecho de que dos o más plásmidos con sistemas de partición o replicación similares no pueden coexistir en el mismo huésped y se segregan durante las divisiones celulares, por lo que son incompatibles, y pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad (93). Cuando dos plásmidos pueden coexistir establemente en la misma célula, se dice que son compatibles y sus sistemas de replicación son diferentes.

b) Número de Copias.

El ciclo de vida de los plásmidos bacterianos consta de dos procesos diferentes: la replicación (rep) por la cual se incrementa el número de copias del plásmido, y la partición (par), en el que se distribuyen las copias del plásmido a las células hijas. Ambos deben estar controlados para asegurar una herencia estable del plásmido en la población bacteriana en crecimiento. Esta información se encuentra en los plásmidos mismos, y los procesos son independientes (91). El número de copias de un plásmido por equivalente cromosómico, depende de rep, y se mantiene estable en condiciones de crecimiento definidas, heredándose como un carácter extracromosómico mediante un fiel mecanismo de segregación a las subsecuentes generaciones; asimismo, varía dependiendo de las condiciones de cultivo, y de algunas características fisiológicas de la célula huésped (91).

Los plásmidos conjugativos (con excepción del plásmido R6K) se mantienen en un número de copias bajo, de 1 a 2 copias, y se dice que están sujetas a un control estricto (20), mientras que los plásmidos no conjugativos se encuentran en números de 10 a 20 copias, y están sometidos a un control relajado (20). Los plásmidos sujetos a un control relajado pueden replicarse en ausencia de síntesis de proteínas del huésped (es decir, en presencia de clo-ranfenicol), mientras que los plásmidos que exhiben un control es-

tricto, son incapaces de replicarse cuando se bloquea la síntesis de proteínas de la célula huésped (64,93).

#### B. PLASMIDOS ST.

Las cepas enterotoxigénicas contienen plásmidos que codifican para LT, ST o para ambas toxinas (37); los genes ST frecuentemente son cotransferidos con marcadores de resistencia a antibióticos (10,37). Los plásmidos que contienen ST y LT se presentan en un rango de peso molecular de 55 a 61 x 10<sup>6</sup> dal y tienden a ser altamente relacionados entre sí mismos y con otros plásmidos F (53), mientras que los plásmidos que solamente contienen genes ST, son heterogéneos, con pesos moleculares de 2.1 a 80 x 10<sup>6</sup> dal, y pueden tener un 33% de homología con plásmidos F, o no presentar ninguna homología con éstos (53,113,121).

En los plásmidos ST, el gene de la enterotoxina puede estar contenido en un transposón (115), así como también, se ha reportado que la resistencia a antibióticos en algunos plásmidos ST se encuentra en transposones (114). Estos elementos genéticos denominados transposones, poseen la característica de integrarse o translocarse de un locus a otro; las funciones de transposición están codificadas en secuencias de inserción denominadas IS que se encuentran a flanqueando a un gene que no está involucrado en dicha transposición y que puede codificar para resistencia a antibióticos y a metales, toxinas, enzimas del metabolismo de carbohidratos, utilización de tolueno, etc. (9). Los elementos IS algunas veces contienen secuencias repetidas directas, es decir, en la misma orientación una con respecto de la otra, o más comúnmente, poseen secuencias repetidas invertidas (9).

Se ha postulado (96,114), que la diversidad de los plásmidos ST se debe a recombinación entre diferentes plásmidos enterotoxigénicos presentes en la misma célula huésped (96), y por la transposición de marcadores de resistencia a antibióticos (114). So y col. (116), reportaron que el gene de ST presente en el plásmido ESF0041 se encuentra flanqueado por secuencias IS<sub>1</sub>, y es parte de

un transposón al que denominaron Tn1681; es posible que la transposición del gene ST, también contribuya con la diversidad de los plásmidos ST.

### C. ESTRUCTURA Y AISLAMIENTO.

Los plásmidos al igual que el DNA cromosómico bacteriano, tienen una estructura de una molécula de doble cadena circular, y covalentemente cerrada (CCC), y pueden aislarse a partir de un buen número de especies bacterianas [por ejemplo: Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus, Haemophilus, Pseudomonas, Neisseria, y varias especies de enterobacterias (20)]; cuando son aislados de células lisadas en condiciones moderadas, poseen una configuración superenrollada, que consiste en un enrollamiento de la molécula circular sobre sí misma, además de la estructura de doble hélice característica del DNA de doble cadena (20). Durante el aislamiento, una proporción del DNA del plásmido sufre rupturas dando lugar a estructuras circulares abiertas (cuando ocurre la ruptura de un enlace fosfodiéster en una de las cadenas) o lineales (cuando ocurre en ambas cadenas) (137).

El superenrollamiento hace que las moléculas de plásmido tengan una estructura más compacta, que se traduce en un menor coeficiente friccional, y por lo tanto en un mayor coeficiente de sedimentación respecto a moléculas lineales y/o circulares abiertas del mismo peso molecular (133); en base a esta propiedad, los plásmidos pueden aislarse en gradientes de velocidad de sedimentación neutros. En gradientes de sedimentación alcalinos también es posible aislar o detectar plásmidos, ya que en condiciones alcalinas el DNA CCC de éstos, por su naturaleza covalentemente cerrada, se compactan, observando un coeficiente de sedimentación mayor al de moléculas lineales y circulares de cadena simple, que se forman en condiciones alcalinas a partir de las lineales y circulares abiertas (137).

Cuando el contenido de GC de un plásmido es distinto al del cromosoma de la bacteria huésped, éstos pueden distinguirse en gradientes isopícnicos de cloruro de cesio (134). Asimismo, los

plásmidos pueden ser aislados o detectados sometiendo lisados de bacterias a electroforesis en geles de agarosa (83).

Uno de los métodos de aislamiento de plásmidos más extendido, fue introducido por Radloff y col. (99), basándose en el comportamiento de flotación del DNA en presencia de EtBr, que es un colorante que al intercalarse produce el desenrollamiento del DNA. En el DNA CCC, debido a las restricciones topológicas que implica la carencia de un extremo libre, la unión de colorante es menor con respecto al DNA lineal o circular abierto; esta observación y la hecha por Bauer y Vinograd (6), de que la densidad de flotación del complejo DNA-colorante es inversamente proporcional a la cantidad de colorante unido, permiten separar la molécula circular del resto de DNA en condiciones de saturación de EtBr. La diferencia observada entre la forma CCC y las moléculas lineales o circulares abiertas, es de  $0.15 \text{ g/cm}^3$ , cuando la concentración de EtBr está a saturación.

#### 4.- EL PROMOTOR E INICIACION DE LA TRANSCRIPCION.

Uno de los principales puntos de regulación de la expresión de los genes, se efectúa a nivel de transcripción, proceso mediante el cual la RNA polimerasa sintetiza RNA a partir de unidades seleccionadas de información genética, presentes en el DNA. El control de las unidades de transcripción se ejerce en el promotor y/o en el terminador, que son los sitios de iniciación y terminación de la transcripción respectivamente.

Generalmente se considera que la fase inicial de la transcripción incluye el reconocimiento de un sitio específico en el DNA de doble cadena por la RNA polimerasa, el desenrollamiento de una región específica adyacente al sitio de reconocimiento, y la incorporación del primer nucleótido de la cadena de RNA (135). La secuencia de DNA necesaria para llevar a cabo estas interacciones se denomina promotor; el sitio que corresponde al primer nucleótido incorporado es llamado sitio o punto de iniciación.

La comparación de las secuencias de DNA de mas de 100 promotores de E. coli (105,89) ha revelado que estas regiones de aproximadamente 60 pares de bases que se asocian a la polimerasa presentan muy poca homología entre sí mismas con excepción de dos regiones de hexanucleótidos mas o menos conservadas, y localizadas a -10 (tambien llamada caja de Pribnow, 97), y -35 pares de bases con respecto del punto de iniciación de la transcripción (105,46 89). Estas regiones constituyen los principales puntos de contacto de la RNA polimerasa con el DNA dentro de la región del promotor y en base a las características de espaciamiento entre éstas, y la conservación de sus secuencias, se ha derivado la secuencia consenso del promotor típico de E. coli (105), la cual puede representarse como sigue:

TTGACA - N<sub>15-19</sub> - TATAAT - N<sub>5-7</sub> -- primer nucleótido  
 (-35)                      (-10)                      transcrito

N, representa cualquier nucleótido. La conservación de las bases en cada posición para los dos regiones varia de un 45% a un 100%.

Las RNA polimerasas de procariotes, generalmente tienen una composición  $\beta\beta'$  <sub>2</sub>, es decir, dos subunidades grandes  $\beta$  y  $\beta'$  (160,000 dal de P.M. promedio), dos subunidades pequeñas  $\alpha$  (40,000 dal de P.M.), y el factor de iniciación  $\sigma$  (de 44,000 a 92,000 dal de P.M.) (18). La unidad central de la polimerasa carece del factor sigma; cuando  $\sigma$  se une a la unidad central de la enzima, ésta última es capaz de reconocer un sitio específico contenido en el promotor (22). La RNA polimerasa se enlaza a este sitio específico de reconocimiento (región -35), formando un complejo cerrado (22). Posteriormente, la enzima puede interaccionar con una segunda región dentro del promotor (región -10) para llevar a cabo una reacción de desenrollamiento dando origen a un complejo abierto (22), que incluye la apertura de las cadenas de DNA a partir del extremo derecho de la región -10 hasta un par de nucleótidos despues del punto de iniciación (135). Las asociaciones de la RNA polimerasa con el DNA en la forma cerrada y abierta, son tambien denominadas complejos binarios.

A la formación del complejo abierto se continua la incorporación del primero y segundo nucleótidos, formandose un enlace fosfodiéster entre ellos, y dando lugar al complejo ternario (RNA polimerasa-DNA-RNA) (135). Una vez formado el complejo ternario, el factor  $\sigma$  es liberado marcando el final de la fase de iniciación (135) y la unidad central de la polimerasa prosigue con la elongación de la cadena de RNA hasta llegar a un terminador.

a) Control positivo de la iniciación.

La iniciación de la transcripción representa un paso muy importante de regulación de la expresión a nivel de transcripción, y puede ser modulada por mecanismos de control positivo (activación) o por control negativo (represión).

Generalmente el control negativo se ejerce por medio de la unión de una molécula represora a un sitio en el promotor denominado operador, lo cual impide la unión de la RNA polimerasa al promotor; los sistemas de E. coli mas estudiados han sido el represor del operon lac (11), y el represor del operon trp (triptofano) (119).

En cuanto al control positivo de la iniciación de la transcripción, se ha definido que un promotor dado, está positivamente regulado cuando requiere de la participación de una proteína que, no siempre está presente, o no siempre es activa en cultivos en crecimiento exponencial (100); Englesberg (38) propuso el término de activador para denominar dicho factor proteico. Esta definición, implica que los promotores regulados positivamente son total o parcialmente funcionales en la presencia de solamente RNA polimerasa. Raibaud y Schwartz (100) compararon las secuencias de 30 promotores regulados positivamente, provenientes de E. coli, varios bacteriofagos, Klebsiella pneumoniae y Rhizobium meliloti, y observaron que éstos, se desvían significativamente de la secuencia consenso típica, particularmente la región -35 y la primera T de la -10. Este hecho ha derivado la proposición de que el desviamiento de los promotores regulados positivamente provoca que la polimerasa no sea reconocida eficientemente, y que el papel del

activador, puede ser el permitir la unión de la polimerasa para que se inicie la transcripción (100).

Varios sistemas sujetos a control positivo han sido analizados en detalle. El primer activador estudiado, el producto del gene ara C (AraC,) (38), actúa como un activador del operon araBAD cuando las bacterias crecen en presencia de arabinosa, sin embargo, también puede actuar como represor sobre el mismo operón en ausencia de arabinosa(100,38). Los mecanismos de control positivo sobre el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia del bacteriofago lamda, efectuados por las proteínas CI y CII del mismo bacteriofago, han sido bien documentados (49,57,100). Por otro lado, el control positivo sobre la iniciación de la transcripción en algunos operones sujetos a represión catabólica (lac, gal, deo, etc.), ha sido extensamente estudiado (29,94,130).

En adición a los mecanismos anteriores, se han descrito otras formas de regulación de la iniciación de la transcripción, como son: modificación en la estructura de la RNA polimerasa (50), modificaciones en la estructura del promotor (103), cambios en la orientación del promotor (103), grado de superenrollamiento del DNA (82), cambios en la especificidad de la iniciación provocada por cambios en la subunidad de la RNA polimerasa (50), y metilación del DNA en el sitio -10 del promotor (103).

##### 5.- REPRESION CATABOLICA.

EFFECTO DE GLUCOSA. Monod (86), describió que en cultivos de E. coli crecidos en presencia de glucosa y lactosa, siempre que hay glucosa, se reprime la habilidad para utilizar lactosa; cuando se agota la glucosa, el crecimiento cesa y se reactiva después de un período requerido para la inducción de las enzimas necesarias para la utilización de lactosa. A este fenómeno de inhibición específica de la inducción de ciertas enzimas por glucosa, se le denominó "efecto de glucosa". En virtud de que la glucosa tiene otros efectos como: represión transitoria.- se observa cuando la glucosa añadida a un cultivo, reprime efectivamente pero transito-

riamente la síntesis de enzimas inducibles; y exclusión de inductores (76) .- se presenta cuando la glucosa bloquea la entrada de inductores o aumenta su salida, se dió el nombre de **Represión Catabólica** al fenómeno observado en medios de cultivo en presencia de glucosa o de otros sustratos rápidamente metabolizables, los cuales provocan una permanente y mas o menos severa represión de enzimas catabólicas.

**MUTANTES cya Y crp.** En 1965, Makmon y Sutherland (81) demostraron que la adición de glucosa a un cultivo produce una caída rápida de los niveles intracelulares de AMPc; posteriormente se describió que la adición de AMPc se sobreponía a la represión ejercida por glucosa en sistemas enzimáticos inducibles (132). Se confirmó un papel fisiológico para el AMPc, con el aislamiento de mutantes en adenilato ciclasa (124). Esta enzima cataliza el paso de la síntesis de AMPc a partir de ATP, y está codificada por el gene **cya**. Las mutantes **cya** manifestaron una deficiencia pleiotrópica en la utilización de diversos carbohidratos, y ésta se revirtió con la adición de AMPc. Seleccionando para el mismo defecto que presentan las cepas **cya**, se obtuvo una clase de mutantes que no revirtió su fenotipo con al agregar AMPc y que además contenía niveles altos de adenilato ciclasa. Se mostró que estas mutantes eran deficientes en una proteína que se une al AMPc, a la cual se le llamó **CRP** (proteína receptora del AMPc) o **CAP** (proteína activadora del catabolismo) (94). Al obtener deleciones de los genes **cya** y **crp**, se demostró que no son indispensable para la viabilidad de *E. coli* y que su papel es mas bien regulatorio (12,107).

**MECANISMO.** El AMPc se une a CRP e induce un cambio conformacional (140) en éste último, lo que le permite unirse específicamente a una secuencia presente en el promotor, el sitio **CAP** (34, 102); como resultado de la unión al sitio **CAP**, CRP estimula la iniciación de la transcripción por la polimerasa, a partir de ese promotor.

CRP es un activador de la transcripción. Este factor, detecta el nivel de AMPc dentro de la célula y activa una variedad de operones y genes estructurales si el nivel de AMPc es elevado (78,

142); asimismo, actúa como represor de la expresión del gene cya (77,15). CRP está compuesta de dos subunidades probablemente idénticas con un P.M. de 22,500 cada una (36); en condiciones fisiológicas, se unen 2 moléculas de AMPC a la holoenzima (121). El sitio CAP tiene una secuencia simétrica (palindrómica) de tal manera que cada monómero puede reconocer una secuencia de información equivalente. Por medio de experimentos de protección con nucleasas, se han identificado 17 sitios CAP (29), en promotores en donde CRP se une para estimular la transcripción, o en donde no se conoce el papel que juega la unión de CRP. De la comparación de la secuencia de estos promotores (29) se observa que la distancia entre los sitios CAP y los puntos de iniciación de la transcripción varían significativamente; por otro lado, se ha propuesto un sitio CAP consenso para CRP (29), tomando en consideración la conservación y posición de las bases de dichos sitios, cuya secuencia es:

NNNNAANTGTGANNTNNNNCANATTNNNNN

En la secuencia consenso se aprecia la doble simetría del sitio CAP (bases resaltadas). En algunos promotores, existen más de un sitio CRP, a los que en ocasiones se les denomina sitios ilegítimos. En el caso del operon lac, el sitio I se encuentra a -62, y el sitio II comprende parte de la región del represor; ambos exhiben un efecto de cooperatividad en ciertas condiciones (130).

Se han propuesto dos modelos principalmente para explicar el aumento en la eficiencia de iniciación de la transcripción por la polimerasa en presencia del complejo AMPC-CRP:

1) CRP estimula la iniciación de la transcripción mediante una interacción directa con la RNA polimerasa, tal, que modifica a dicha polimerasa y facilita su vez su interacción con el promotor (46). Aunque no se ha demostrado un contacto directo entre la polimerasa y CRP, en el promotor del operon lac el sitio CAP requiere de un espaciamiento preciso en relación a las regiones -10 y -35 para ser funcional, lo cual pudiera apoyar esta hipótesis (79) Este mecanismo ha sido inferido en la activación del promotor P<sub>RM</sub> por CI en el bacteriofago lamda (103).

2) La acción de CRP es la de desestabilizar la doble hélice cuando se une al sitio CAP, provocando una perturbación en la configuración del DNA del promotor, con lo cual habilita la interacción de la RNA polimerasa con dicho promotor (34). Este modelo es compatible con el hecho de que, en varios promotores regulados por el complejo AMPc-CRP, el sitio CAP se encuentra localizado en diferentes posiciones. Por otra parte, no parece ser congruente con las propiedades de lac en cuanto a la necesidad de un espaciamiento preciso para el sitio CAP, y a que no se ha detectado ningún desenrollamiento de la doble cadena del promotor al llevarse a cabo la unión de CRP al sitio CAP (29,35).

El hecho de que el sitio CRP difiera tanto de posición en diferentes operones (-35 gal, -62 lac, -90 ara y -92 en deo) sugiere que el nivel al que actúan el complejo AMPc-CRP no es único. AMPc y CRP modulan su interacción con la polimerasa, para conseguir (108):

- 1) Control Positivo. AMPc-CRP aumenta la eficiencia de iniciación de transcripción de la RNA polimerasa [operones lac, gal, ara, etc. (130)].
- 2) Control Negativo. Generalmente, por competición; en el caso de gal P2 la unión del complejo AMPc-CRP al sitio CRP, bloquea la unión de la polimerasa. (108)
- 3) Terminación de la transcripción. Se ha sugerido en la ausencia del complejo AMPc-CRP en el operon de galactosa, la transcripción es terminada prematuramente (131)

Existen aproximadamente 30 genes descritos, en los que se ha demostrado una regulación positiva, negativa o ambas por el complejo AMPc-CRP. Estos incluyen varios operones para la utilización de carbohidratos (lactosa, galactosa, arabinosa, maltosa, etc.) (94,130), la proteína membranal OmpA (29), el establecimiento de la lisogenia de bacteriofagos temperados (49,57), la síntesis de colicina El (62), pili tipo I (54), etc.

## 6.- ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA REPRESION CATABOLICA DE LA ACTIVIDAD DE ST.

En experimentos realizados con la enterotoxina ST de origen porcino, Alderete y Robertson (3) observaron una reducción en los niveles de actividad de ST extracelular cuando usaban como fuente de carbono en el medio de cultivo glucosa, en lugar de glicerol. Se obtuvieron los mismos niveles de ST cuando los cultivos con glucosa como fuente de carbono fueron suplementados con AMPc, el cual, incrementó de 4 a 8 veces el nivel de toxina de los cultivos con glucosa. Estas observaciones sugirieron que la enterotoxina ST podría estar regulada por el complejo AMPc-CRP.

En base a las observaciones previas, se iniciaron estudios en este laboratorio, para establecer si la enterotoxina ST de origen humano codificada por el plásmido pYK007 (ST<sup>+</sup> Ap<sup>r</sup>) se encontraba bajo represión catabólica, y si dicha regulación se ejercía directamente sobre la síntesis de la toxina, a nivel de transcripción del gene de ST, o se daba a algún otro nivel (inestabilidad del plásmido, pérdida del gene ST, etc).

Dos evidencias, principalmente, apoyaron la noción de represión catabólica de ST (Martínez C., M.G., Tesis de Maestría)(80):

1) Efecto de *cya* y *cya crp* sobre la actividad extracelular de la enterotoxina ST. En estos estudios se utilizaron las cepas deletadas en *cya* (CA8306) (mutante incapaz de sintetizar adenil ciclasa), *cya crp* (CA8445) (mutante incapaz de sintetizar adenil ciclasa y que también carece de la proteína receptora de AMPc) y una cepa isogénica silvestre (CA8000). A este juego de cepas se les introdujo por transducción generalizada la mutación *rpsL* (Sm<sup>r</sup>).

El plásmido pYK007 fue transferido por conjugación de la cepa J54 (pYK007) a las cepas silvestre, *cya*<sup>Δ</sup> y *cya*<sup>Δ</sup> *crp*<sup>Δ</sup>, Sm sensibles y resistentes, y las transconjugantes Ap<sup>r</sup>, crecidas en diferentes medios y fuentes de carbono, fueron analizadas para actividad de

ST en presencia y ausencia de AMPc. La tabla 1 contiene los resultados de estos experimentos; se observa que las cepas  $cya^{\Delta}$  crecidas en medio T suplementado con AMPc, muestran un incremento en actividad toxigénica extracelular de al menos 100 veces con respecto al mismo medio en ausencia de AMPc, obteniéndose niveles comparables a los de la cepa silvestre (CA8000). La cepa JK8445 ( $cya^{\Delta} crp^{\Delta} rpsL$ ) no presentó ST activa en presencia o ausencia de AMPc, mientras que en la CA8445 ( $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$ ), en presencia de AMPc, se detectaron niveles de actividad 42 veces mas bajos con respecto a la cepa silvestre.

2) Efecto del AMPc sobre la cinética de las actividades de ST y  $\beta$ -galactosidasa en la cepa CA8306 (pYK007) ( $cya^{\Delta}$ ). Como se refirió en la introducción, la regulación positiva del complejo AMPc-proteína receptora del AMPc sobre el operón de lactosa, ha sido claramente establecida *in vivo* (142) e *in vitro* (78), por lo cual, la cinética de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en presencia y ausencia de AMPc, constituyó un parámetro de comparación conveniente para la cinética de actividad de ST en las tales condiciones. Cuando se compararon las cinéticas de actividad de  $\beta$ -galactosidasa y ST en la cepa  $cya$  (pYK007), en presencia y ausencia de AMPc, se apreció que ST responde de manera similar a  $\beta$ -galactosidasa, encontrándose que sólo se detecta la actividad de ambas en presencia de AMPc.

La dependencia de las actividades de  $\beta$ -galactosidasa y ST por AMPc en la cepa  $cya^{\Delta}$ , sustenta los resultados previos en donde, en el mismo fondo genético, se detectaron niveles de toxina 100 veces mas altos en presencia de AMPc comparado con la ausencia del mismo. Estos datos, indicaron un efecto de regulación positiva del AMPc sobre la actividad de ST.

Para demostrar que la información genética original codificada por pYK007 está aún presente en las cepas que fenotípicamente fueron ST<sup>-</sup>, dicho plasmido fué transferido de estas cepas a la cepa J54; 10 transconjugantes J54 Ap<sup>r</sup> fueron probadas para actividad de enterotoxina extracelular activa, encontrándose un ligamiento

TABLA 1. Efecto del AMPc sobre la actividad toxigénica de ST

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	MEDIO	AMPc	ACTIVIDAD DE ST <sup>a</sup>
CA8000 (PYK007)	Silvestre	Mínimo, glucosa	-	1
		Mínimo, glucosa	+	2
		Mínimo, glicerol	-	2
		Mínimo, glicerol	+	2
		T	-	16
		T	+	32
CA8306 (pYK007)	cya <sup>Δ</sup>	Mínimo, glucosa	-	0
		Mínimo, glucosa	+	2
		T	-	0.16 <sup>b</sup>
		T	+	16
CA8445 (pYK007)	cya <sup>Δ</sup> crp <sup>Δ</sup>	T	-	0
		T	+	0.38 <sup>b</sup>
JK8000 (pYK007)	rpsL	T	-	16
		T	+	32
JK8306 (pYK007)	cya <sup>Δ</sup> rpsL	T	-	>0.2 <sup>b</sup>
		T	+	16
JK8445 (pYK007)	crp <sup>Δ</sup> rpsL	T	-	>0.2 <sup>b</sup>
		T	+	>0.2 <sup>b</sup>

Actividad de ST<sup>a</sup>: recíproca de la dilución a la cual, sobrenadantes de cultivos de 6 hrs. dieron una respuesta positiva en el ensayo de ratón lactante.

<sup>b</sup>: Estos sobrenadantes fueron concentrados por ultrafiltración (Amicon UM-05) de 100 a 16, 38 y 20 mls., respectivamente.

Ap<sup>r</sup> ST<sup>+</sup> del 100% y 90% para las cepas silvestre y cya<sup>Δ</sup>, respectivamente (tabla 2). El ligamiento Ap<sup>r</sup> ST<sup>+</sup> en la cepa CA 8445 (cya<sup>Δ</sup> crp<sup>Δ</sup>) fué variable en los 4 experimentos realizados, observándose valores del 50% al 10%.

El hecho de que la actividad de ST ligada a Ap<sup>r</sup> pueda ser transferida y expresada en la cepa receptora (cya<sup>+</sup> crp<sup>+</sup>), implica que las cepas donadoras poseen la información genética original codificada por el pYK007. Si bien se puede afirmar lo anterior para las cepas silvestre y cya<sup>Δ</sup>, para la cepa cya<sup>Δ</sup> crp<sup>Δ</sup> sólo es aplicable de manera parcial, ya que de 50% a 90% de las transconjugantes Ap<sup>r</sup> no produjeron ST activa, sin embargo, se puede aseverar que la cepa cya<sup>Δ</sup> crp<sup>Δ</sup> tuvo la información genética para la que codifica el pYK007, y parte de esa población, aún la posee. Por otro lado, la variabilidad en el ligamiento ST<sup>+</sup>, Ap<sup>+</sup> en la cepa cya<sup>Δ</sup> crp<sup>Δ</sup>, podría deberse a que el gene ST (y/o el gene de ampiciлина) se encontrara en un transposón cuya pérdida se vea favorecida por la ausencia del complejo AMPc-CRP (110).

Por último, se investigó la posibilidad de que los bajos niveles de ST activa en las cepas cya<sup>Δ</sup> crp<sup>Δ</sup> y en la cepa cya<sup>Δ</sup> en ausencia de AMPc se manifiesten como resultado de una segregación del plásmido pYK007 favorecida por las condiciones de represión catábólica en estas cepas (i.e., ausencia del complejo AMPc-CRP). Los resultados de estos experimentos se localizan en la última columna de la tabla 2, en la que se muestra que el marcador Ap<sup>r</sup> conferido por pYK007 fué estable en todas las cepas probadas. Lo anterior indicó que no existe una pérdida preferencial del plásmido pYK007 en las mutantes cya<sup>Δ</sup> y cya<sup>Δ</sup> crp<sup>Δ</sup>.

Los datos presentados en la tabla 2, eliminan la posibilidad de que el efecto del AMPc sobre la actividad de la enterotoxina ST en la cepa cya<sup>Δ</sup> (tabla 1), pueda darse como resultado de la segregación del plásmido pYK007 o por la modificación del gene ST contenido en dicho plásmido.

TABLA 2. Efecto de  $cya^{\Delta}$  y  $crp^{\Delta}$  sobre la estabilidad de la frecuencia de transferencia y sobre la integridad de pYK007.

Donadora	Frecuencia de transferencia/ $10^5$ donadoras <sup>a</sup>					Ligamiento (ST <sup>+</sup> -Ap <sup>r</sup> )	Estabilidad de pYK007 <sup>b</sup>
	15min	30min	45min	60min	120min		
CA8000 (pYK007)		0.16	0.83	0.57	0.85	1	0.99
CA8306 (pYK007)	0.094	0.4	1.0	8.9	9.6	0.9	0.98
CA8445 (pYK007)		0.35	0.71	4.8	7.8	0.5, 0.2 0.4, 0.1	1.02

<sup>a</sup> Cultivos en fase exponencial en medio L a 37°C, fueron, crecidos hasta una densidad de  $3 \times 10^8$  células/ml, mezclados (1:2, J54 Nal<sup>r</sup> a donador) e incubados sin agitación a 37°C; muestras fueron tomadas a los tiempos indicados, diluidas y espatuladas en cajas de L con ampicilina y ácido nalidixico. 10 transconjugantes Ap<sup>r</sup> de cada cruz a fueron ensayadas para actividad de ST.

<sup>b</sup> Un cultivo en crecimiento exponencial de la cepa J54(pYK007) fué usado como donadora en conjugación con las cepas receptoras CA8000, CA8306 y CA8445. 5 y 6 transconjugantes de las cepas CA8000 y CA8306, respectivamente, seleccionadas en agar mínimo Ap y, 6 transconjugantes de la cepa CA8445 seleccionadas en cajas de L Ap Sm, fueron purificadas dos veces en el mismo medio. Después de confirmar el fenotipo de las transconjugantes, éstas fueron ensayadas para la estabilidad del plasmido pYK007 como sigue: cultivos de cada aislamiento fueron crecidos a 37°C por 18 hrs., en medio L con Ap; la suspensión fué diluida a  $10^3$  células/ml en medio L sin Ap e incubado con vigorosa agitación por 8 hrs. Los cultivos fueron diluidos para determinar la cuenta viable en cajas de L con y sin ampicilina.

<sup>c</sup> Los experimentos de transferencia fueron hechos con 4 aislamientos independientes de CA8445 (pYK007) para la determinación del ligamiento Ap<sup>r</sup>-ST<sup>+</sup>.

**OBJETIVO:**

Se ha descrito el estudio preliminar realizado en este laboratorio cuyos resultados sugirieron que la enterotoxina ST codificada por el plásmido pYK007 se encuentra regulada por el complejo AMPc-proteína receptora del AMPc; en base a éstos, se propuso como hipótesis de trabajo que la enterotoxina ST codificada por pYK007 está sujeta a represión catabólica, y la demostración de esta hipótesis constituyó el objetivo general del presente trabajo.

Previamente se indicó que el plásmido pYK007 es estable en las cepas silvestre,  $cya^{\Delta}$  y  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$ , y que la actividad enterotoxigénica puede ser transferida y expresada, por lo cual el fenotipo  $ST^{-}$  exhibido por las cepas  $cya^{\Delta}$  en ausencia de AMPc, y por la cepa  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$ , no se debe a la inestabilidad del plásmido, o a la inhabilidad de producir toxina activa por pYK007. Sin embargo, se puede observar el mismo efecto si el control de número de copias de pYK007 es el que se encuentra regulado por el complejo AMPc-proteína receptora del AMPc, de forma que en ausencia de este complejo, el número de copias del plásmido por equivalente genómico disminuyera.

Considerando lo anterior, el objetivo de la primera parte de este trabajo fué el establecer el efecto de las deleciones  $cya$  y  $cya crp$  sobre la replicación del plásmido pYK007, determinando si existe una diferencia en el número de copias de pYK007 en cepas deficientes en la formación del complejo AMPc-CRP tal, que explique los niveles de actividad toxigénica en estas cepas. Para la determinación del número de copias de pYK007, se seleccionó la metodología de la cuantificación del DNA superhelicoidal a partir de lisados crudos de las cepas, empleando gradientes analíticos de CsCl-EtBr; de encontrarse diferencias significativas, se visualizó la aplicación de técnicas de hibridización DNA:DNA.

Tomando en cuenta que la enterotoxina ST es una proteína exportable, se podría plantear que las mutantes deficientes en represión catabólica están alteradas en su capacidad de secreción y/o activación de ST, provocando una acumulación de la toxina intracelular ya sea activa, o inactiva. Esta explicación sería compatible con los niveles bajos de toxina extracelular que se observaron en las cepas  $cya^{\Delta}$   $crp^{\Delta}$  y  $cya^{\Delta}$ ; en base a esta posibilidad, en la segunda parte del trabajo se planteó el análisis del contenido intracelular de enterotoxina ST en las cepas deficientes en represión catabólica, empleando extractos sonicados de las mismas, con el objeto de determinar si existe una acumulación de toxina ST activa en el interior de éstas cepas.

## MATERIALES Y METODOS.

### 1.- CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.

En la tabla 3 se describen las cepas y plásmidos usados.

### 2.- MEDIOS DE CULTIVO.

El medio L (85) fué empleado en los experimentos de marcaje con  $^3\text{H}$ -timidina, en el aislamiento de DNA por el método de nitrocelulosa, y en general se usó en todos los cultivos, a menos que se indique otro medio; consistió en: Bacto triptona (10 g), extracto de levadura (5 g), NaCl (10 g), se llevó a un pH de 7.0 con 1 M NaOH, y se aforó a un litro con agua destilada. Los marcajes con  $^{14}\text{C}$ -timina se efectuaron en medio mínimo M9 (66):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3 g), NaCl (0.5 g), y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1g); se aforó a un litro con agua, y esterilizó. Posteriormente, se agregó: glucosa al 0.2%,  $\text{MgSO}_4$  al 0.01%, y 5 g de casaminoácidos. En los experimentos de sonicación, y siempre que se midió actividad de ST, se utilizó el medio T<sup>2</sup> (38a): Casaminoácidos (con vitaminas) (20 g), extracto de levadura (6 g), NaCl (2.5 g), y  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (8.7 g); se ajustó a un pH de 8.5, se aforó a un litro con agua destilada, y se esterilizó. Una vez esterilizado, y frio, se añadió 1 ml de solución de metales, que presentó la siguiente composición:  $\text{MgSO}_4$  al 5%,  $\text{MnCl}_2$  al 0.5%, y,  $\text{FeCl}_3$  al 0.5%, disueltos en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.001 N.

---

<sup>2</sup>El medio T original descrito por Evans y col. (38a) contiene 1.5 g/l de extracto de levadura, mientras que el empleado en este trabajo, contuvo 6 g/l.

TABLA 3. Cepas Bacterianas y Plásmidos.

Cepas y Plásmidos	Genotipo o Fenotipo relevante	Origen y comentarios
<b>Cepas</b>		
40IEC-4	(ST <sup>+</sup> Ap <sup>r</sup> Tra) Tc <sup>r</sup>	Cepa original clinica que alberga pYK007 (121).
78IEC	Indefinido	Posee 8 plásmidos usados como marcadores de PM(121)
7A-35	(ST <sup>+</sup> Ap <sup>r</sup> Tra) pro 22 met 63 Nal <sup>r</sup>	pYK007 transferido por conjugación de la cepa 40IEC-4 a la J54 (121).
CR34	F <sup>-</sup> thr <sup>-</sup> leu <sup>-</sup> thi <sup>-</sup> thy <sup>-</sup> lac <sup>-</sup>	(8).
J54	pro 22 met 63 Nal <sup>r</sup>	Nal <sup>r</sup> espontánea de J53(31)
CA8000	HfrH thi <sup>-</sup>	(12).
CA8306	HfrH thi <sup>-</sup> cya <sup>Δ</sup>	(12).
CA8445	HfrH thi <sup>-</sup> cya <sup>Δ</sup> crp <sup>Δ</sup> rpsL	(107).
<b>Plásmidos</b>		
pYK007	ST <sup>+</sup> Ap <sup>r</sup> Tra	Transferido a J54 por conjugación con 40IEC-4; transferido a todas las demas cepas por conjugación con J54(pYK007) (121)
pYK008	ST <sup>-</sup> Ap <sup>r</sup> Tra	Transferido a J54 por conjugación con CA8445 (pYK007) (121).

### 3.- AMORTIGUADORES.

En los experimentos donde se manipuló DNA (excepto en la determinación del complejo de relajación), el amortiguador TES tuvo la siguiente composición: Tris base (0.05 M), EDTA (0.005 M), NaCl (0.05 M), pH 7.8 o pH 8.0. El TES usado en los experimentos de complejo de relajación fué: Tris (0.03 M), EDTA (0.005 M), NaCl (0.05 M), pH 8.0. Para el corrimiento y elaboración de los geles de agarosa se empleó el amortiguador TB, (Tris-Boratos): Tris (89 mM), EDTA (2.5 mM), ácido bórico (89 mM), pH 8.2. La composición de los amortiguadores usados en los experimentos de hibridización fué, para TSE-2/KCN: Tris (0.1 M pH 8.0), NaCl (0.5 M), EDTA (0.01 M), KCN (0.01 M); para SSC: NaCl (0.15 M), Citrato de sodio (0.015 M), pH 7.0. Através de los protocolos de fijación de DNA a filtros e hibridización, se refieren 6x SSC, 2x SSC, 0.1x SSC, etc., lo cual indica las veces que está concentrada la solución patrón (1x), que es la referida anteriormente. En los experimentos de sonicación y determinación de actividad de ST se empleó el amortiguador PBS: NaCl (0.137 M), KCl (0.003 M), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.016 M), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.002M), pH 7.4.

### 4.- LIQUIDOS DE CENTELLEO.

En los conteos de muestras radiactivas en papel filtro se utilizó el liquido de centelleo Tolueno-PPO (5 g de PPO por galón de tolueno). En algunos experimentos, las muestras provenientes de lisados claros o lisados totales se contaron directamente (en solución) con el coctel Tolueno-PPO-Tritón x-100: Tolueno (1 litro), Tritón x-100 (600 ml), PPO (3.5 g), H<sub>2</sub>O (168 ml).

5.- AISLAMIENTO DE PLASMIDOS POR EL MINIMETODO DE NITROCELULOSA. (121).

Cultivos crecidos durante la noche fueron diluidos 1:50 en 3 ml de medio L y se incubaron con agitación a 37°C hasta alcanzar 100 U.K.. Las células fueron cosechadas, lavadas dos veces con 3 ml de TES, resuspendidas en 120  $\mu$ l de sacarosa al 0.25% (disuelta en Tris 50 mM pH 8.0) e incubadas 5 min a 4°C en baño de hielo; se agregaron: 24  $\mu$ l de lisozima (5 mg/ml en Tris 50 mM pH 8.0), 48  $\mu$ l de 0.25 M EDTA pH 8.0 (con intervalos de incubación de 5 min), y 60  $\mu$ l de Mezcla Litica (Tritón x-100 0.3%, EDTA 187 mM, Tris 150 mM pH 8.0). Transcurridos 15 min, se añadieron: 48  $\mu$ l de NaCl 5M, 120  $\mu$ l de agua estéril, y 84  $\mu$ l de pronasa (5 mg/ml en TES, predigerida 15 min a 37°C). Después de cada adición, los tubos se mezclaron por inversión, y la mezcla final se incubó por 15 min a 37°C. Posteriormente se adicionaron 500  $\mu$ l de fenol (destilado y saturado con TES) y 250  $\mu$ l de cloroformo a la muestras, y se mezclaron durante 25 min en un rotador. Las fases acuosa y fenólica fueron separadas centrifugando por 5 min (Eppendorf, modelo 5414) (la centrifugación se realizó a 15,000 x g en éste y en los pasos siguientes); se recuperó la fase acuosa, a la cual se agregó 1 ml de éter saturado con TES y se invirtió por 2 min, descartándose la fase de éter (se repitió una vez mas la extracción con éter). Las muestras fueron llevadas a un pH de 12.0 con NaOH 5 M, incubadas a 37°C por 30 min, y ajustadas de nuevo al pH original, entre 7.7 y 8.0, con HCl 2 N. Se añadieron 0.5 g de nitrocelulosa, y se mezcló por inversión durante 15 min, después de los cuales, las muestras se centrifugaron por 3 min para sedimentar la nitrocelulosa; a los sobrenadantes se adicionaron 50  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M pH 6.0 y 1 ml de etanol absoluto a -20°C. El DNA fué precipitado a esta temperatura por 18 hr, se recuperó centrifugando por 15 min, y se resuspendió en 200  $\mu$ l de acetona; ésta, fué eliminada despues de una centrifugación por 3 min. Finalmente, las pastillas con el DNA de plásmido, fueron secadas al aire, y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de 0.1 x TES.

**Preparación de nitrocelulosa (13a):** La nitrocelulosa (RS125-175) se pulverizó finamente en una licuadora, se secó a 70°C durante 60 min, se lavó con agua destilada 4 veces, se incubó 16 hr a 70°C con una solución de KCL (0.06M) y Tris (0.01M pH 7.3) y finalmente, fué lavada 4 veces con agua bidestilada.

#### 6.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA (121).

Se preparó agarosa al 0.7% en amortiguador TB, liquada por ebullición, se virtió entre dos placas de vidrio separadas por espaciadores de 1.5 mm, y se colocó el peine inmediatamente; las placas fueron previamente selladas con agarosa al 1.0%, y con una esponja en la base. Una vez que gelificó se retiró el peine, el gel fué adaptado al aparato de electroforesis, y se llenaron los resorvorios de éste último con TB. A cada una de las muestras de DNA de plásmido en 50 µl de 0.1 x TES, se agregaron 10 µl de una solución de azul de bromofenol (Azul de bromofenol 0.07 %, glicerol 33 %, SDS 7 %), y se depositaron en los pozos del gel. La corrida se efectuó aplicando una diferencia de potencial de 125 voltios durante 6 hr, después de las cuales, el gel fué transferido a un recipiente con una solución de EtBr al 0.4 %. Transcurridos 15 min, se lavó el exceso de EtBr con agua destilada por 30 min. Por último, las bandas de DNA en el gel fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta de onda larga (La Jolla Scientific, Co., modelo LJ-8) y se fotografió con una cámara (Polaroid Land MP 4) equipada con un filtro amarillo (Kodak, Wratten no. 7) empleando una película con negativo (Kodak, polaroid tipo 55).

#### 7.- TRATAMIENTO DE MUESTRAS RADIATIVAS EN PAPEL Y CONDICIONES DE CONTEO.

Toda vez que se contó DNA aplicado a papel filtro, se siguió el siguiente procedimiento: Cuadros de papel filtro de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> (Whatman 3 MM) fueron marcados con lápiz, colocados sobre papel aluminio, las muestras radioactivas aplica-

das, y secados bajo una lámpara de luz infraroja. Los papeles fueron depositados en un vaso de precipitados y se agregó suficiente TCA al 10% frío, para cubrir los papeles; transcurridos 15 min a 4°C, se desechó el TCA y se adicionó etanol al 95% frío, y se incubó a 4°C por otros 15 min. El etanol también fue desechado, y se añadió éter a temperatura ambiente; después de 5 min, se descartó el éter y se secaron los papeles con aire. Una vez secos se colocaron en viales de centelleo, se agregaron 7 ml de líquido de centelleo tolueno-PPO, y se determinó la radioactividad de las muestras.

Los procedimientos aplicados para el establecimiento y optimización de las condiciones de conteo que se describen a continuación, se encuentran detallados en el apéndice. Los viales de centelleo con muestras radiactivas en papel fueron contadas (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer modelo 3385) con una amplificación de 60 % para  $^3\text{H}$ , y de 11.5 % para  $^{14}\text{C}$ , y con un discriminador de ventana de 50 - 1000. Para el conteo simultáneo de doble isótopo ( $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ ), se contó con las condiciones siguientes:

	AMPLIFI- CACION	VENTANAS	PASO	FACTOR DE CORRECCION	EFICIENCIA
$^3\text{H}$	60.0 %	50 - 272	a $^{14}\text{C}$ = 0.1 %	1.8461	32 %
$^{14}\text{C}$	11.5 %	221 - 1000	a $^3\text{H}$ = 10.0 %	1.5172	78 %

#### 8.- CINÉTICA DE INCORPORACION DE $^3\text{H}$ -TIMINA.

Cultivos de la cepa J54 (pYK007) crecidos durante la noche en medio mínimo suplementado, fueron diluidos 1:50 en 30 ml del mismo medio e incubados con agitación a 37°C; cada 10 min se midió la turbidez de los cultivos (fotocolorímetro Klett-Summerson, modelo 800-3, 520-580 nm). Al tiempo cero, o cuando el cultivo llegó a 30 U.K., se agregaron deoxiadenosina (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y  $^3\text{H}$ -timina (0.1 l/10 ml de cultivo); desde el momento de la adición de la marca, se tomaron 2 alícuotas de 0.5 ml de cultivo con intervalos de 10

min, hasta que el cultivo alcanzó 140 U.K. Inmediatamente después de tomar las alicuotas, éstas se agregaron a tubos en baño de hielo conteniendo 2.5 ml de TCA al 5 % frío, agitando vigorosamente después de cada adición, y se mantuvieron en hielo hasta coleccionar la última alicuota. Las muestras en TCA fueron coleccionadas en filtros de nitrocelulosa por succión al vacío (los filtros se pretrataron incubando en TCA al 5 % y 200 µg/ml de timina fría); los tubos se lavaron tres veces con 3 ml de agua y una vez con 3 ml de agua en ebullición, y los lavados se coleccionaron en el filtro de la muestra correspondiente. Después de que los filtros fueron secados, se contaron en viales de centelleo con 7 ml de tolueno-PPO.

#### 9.- MARCAJE DE CULTIVOS CON <sup>3</sup>H-TIMIDINA (65).

Cultivos crecidos durante la noche fueron diluidos 1:50 en medio L e incubados a 37°C con agitación; cuando llegaron a una densidad óptica de 80 U.K., se agregó <sup>3</sup>H-timidina (0.1ml/ 10 ml de cultivo) al cultivo y se continuó el crecimiento del mismo durante 10 min, que en las condiciones usadas, correspondió a llegar a 100 U.K. o 105 U.K. ( $5 \times 10^8$  células/ml). Las células se transfirieron inmediatamente a un baño de hielo y se procesaron según el protocolo experimental seleccionado.

#### 10.- MARCAJE DE CULTIVOS CON <sup>14</sup>C-TIMINA.

Cultivos desarrollados durante la noche en medio M9 suplementado con casaminoácidos y glucosa, fueron diluidos 1:50 en el mismo medio e incubados con agitación a 37°C, hasta que alcanzaron 40 U.K.. A este tiempo se adicionaron al medio 300 µg/ml de deoxiadenosina, y 0.1 ml de <sup>14</sup>C-timina por cada 10 ml de cultivo. Se continuó el crecimiento de los cultivos a 37°C, y cuando registraron una densidad óptica de 100 U.K. se les transfirió a un baño de hielo. A partir de aquí, las células se procesaron según el protocolo experimental seleccionado.

11.- LISADOS CRUDOS Y GRADIENTES ANALITICOS DE CsCl-EtBr PARA LA DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS (7).

5 ml de cultivos de las cepas CA8000 (pYK007), CA8306 (pYK007), CA 8445 (pYK007), J54 (pYK007) y J54 (pYK008) se marcaron con  $^3\text{H}$ -timidina como se describe en el método 9, y 26 ml de la cepa J54 (pYK007) con  $^{14}\text{C}$ -timina como en 10. Al llegar a 100 U.K., 5 ml del cultivo marcado con  $^{14}\text{C}$  fué adicionado a cada 5 ml de los diferentes cultivos marcados con  $^3\text{H}$ -timidina; las mezclas de 10 ml por cultivo fueron transferidas a tubos de centrifuga, y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min, a  $4^\circ\text{C}$  (Sorvall RC-5B, Du Pont Inst., rotor SS-34). Las pastillas fueron lavadas una vez con 2 ml de TES frio, y se resuspendieron en 1 ml de TES que contenía: lisozima (1 mg), sacarosa (100 mg), y RNasa (500  $\mu\text{g}$ ) preincubada 5 min a ebullición en acetato de sodio (0.05M, pH 4.6). Una vez resuspendidas, se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 10 min, se transfirieron a un baño de hielo, y se añadió 0.5 ml de Sarkosyl (al 2% en agua). A estas muestras, se adicionó 1 ml de TES que se mezcló tomando un volumen de 1 ml con pipeta de 1 ml y regresando la solución a una velocidad de 0.3 ml/seg. Este último paso se repitió veinte veces (se observó buena ruptura del DNA cuando ya no salió de la pipeta en forma continua, sino en gotas).

Para 2 ml de lisados crudos: se pesaron 13.1 g de CsCl y se depositaron en tubos de vidrio de 40 ml; allí se añadieron 2 ml de lisado, y 11 ml de agua destilada esterilizada. Se taparon los tubos con parafilm, y se disolvió el CsCl agitando gentilmente por inversión; se agregaron 0.7 ml de EtBr (5 mg/ml), y de nuevo, se agitó por inversión hasta tener una solución homogénea. Las muestras fueron transferidas a tubos de polialómero (prehervidos 5 min en TES) para el rotor 60 Ti (Beckman), se adaptaron las tapas de los tubos, y se llenó la cámara de aire con aceite mineral, eliminando todas las burbujas. Durante el procedimiento de cerrado, los tubos se cubrieron con papel aluminio para evitar rompimiento del DNA debido a la incidencia de luz sobre en el complejo DNA-EtBr.

La centrifugación se realizó a 45,000 rpm y 15°C durante 36 horas (sin freno), en una ultracentrífuga Beckman modelo L5-65, o L8-55. Los gradientes fueron colectados como se describe en el método 14.

#### 12.- DETERMINACION DEL COMPLEJO DE RELAJACION EN GRADIENTES ANALITICOS DE VELOCIDAD DE SEDIMENTACION (66).

30 ml de cultivos de las cepas del juego isógeno cya<sup>Δ</sup> y crp<sup>Δ</sup> con el plásmido pYK007 o de la J54 (pYK007), se marcaron con <sup>3</sup>H-timidina como se indica en el método 8. Cuando los cultivos llegaron a 100 U.K., las células fueron cosechadas por centrifugación a 10,000 rpm, durante 10 min, a 4°C (todos los pasos subsiguientes se efectuaron en un baño de hielo y las soluciones añadidas se enfriaron previamente). Las pastillas fueron lavadas dos veces con TES, y se resuspendieron en 1 ml de 25% sacarosa (en Tris 0.05 M, pH 8.0). Se agregaron 0.2 ml de lisozima (5 mg/ml en Tris 0.25 M pH 8.0), se mezcló suavemente, y se incubó por 5 min; igualmente, se añadieron 0.4 ml de EDTA (0.25 M pH 8.0) y se incubó por otros 5 min. Las muestras fueron lisadas por la adición de 1.6 ml de mezcla lítica (Triton X-100 al 0.2 %, EDTA 0.0625 M, y Tris 0.05 M pH 8.0); transcurridos 15 min, los lisados crudos se clarificaron por una centrifugación de 15 min a 18,000 rpm (rotor SS-34, Sorvall), sin freno, a 4°C. El lisado claro (sobrenadante), conteniendo predominantemente DNA de plásmido, se decantó con cuidado deteniendo la pastilla con una pipeta pasteur, y se mantuvo en baño de hielo. La pastilla, compuesta por DNA cromosómico y restos celulares, se resuspendió en una solución de la misma composición del lisado claro, y alícuotas de ambos se contaron con el coctel tolueno-tritron X100-PPO, para estimar el porcentaje y cantidad de cuentas en el lisado claro.

Para el análisis de velocidad de sedimentación de los complejos de relajación se emplearon gradientes preformados de 5 ml de sacarosa neutros, del 5%-20% (w/v) y del 20%-31% (w/v), en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Las soluciones de

sacarosa se prepararon en TES con baja sal (0.05 M NaCl), media (0.5 M NaCl) ó alta sal (1 M NaCl), y se esterilizaron en autoclave. En ocasiones se incluyó al fondo del gradiente, un colchón de sacarosa al 50% en TES. Típicamente, se aplicaron a los gradientes, 150  $\mu$ l de los lisados claros en un volúmen final de 300  $\mu$ l (llevando al volúmen final con TES). Cuando se indujo la relajación de los complejos, las muestras de 300  $\mu$ l contuvieron SDS (al 0.25 %) o EtBr (300  $\mu$ g/ml). La ultracentrifugación se realizó a 45,000 rpm, en el rotor SW50.1 (Beckman), a 15°C. Los tiempos de centrifugación variaron para los diferentes experimentos y concentraciones de sacarosa, comunmente la corrida se efectuó por 45 min o 1 hr. El fraccionamiento de los gradientes se describe en el método 14.

### 13.- GRADIENTES PREPARATIVOS DE CsCl-EtBr Y DE SACAROSA.

Los gradientes preparativos se emplearon para el aislamiento y purificación de plásmidos marcados radiactivamente. A continuación se describe el procedimiento usado en relación al tipo de gradiente.

CsCl-EtBr: Cuando se requirió que el plásmido estuviese marcado con  $^3\text{H}$ , se emplearon cultivos de 30 o 100 ml, marcados como se describe en el método 9; para plásmidos marcados con  $^{14}\text{C}$ , se marcaron 30 ml de cultivo como se indica en el método 10. Una vez obtenidos los cultivos marcados, se generaron lisados claros por el método de lisozima-EDTA-mezcla lítica con tritón (método 12), adaptando las cantidades cuando se procesaron 100 ml. Con los lisados claros se preparon gradientes de CsCl-EtBr, con la relación siguiente: a cada 3.8 ml de DNA (lisados claros mas TES), se añadió, 3.55 gr de CsCl (seco y mantenido en desecador) y 0.3 ml de EtBr (5 mg/ml). La elaboración de los gradientes y las condiciones de ultracentrifugación fueron iguales a las descritas en el método 11, exceptuando el uso del rotor 50Ti para los gradientes preparativos. La colección de las fracciones y el procesamiento de las muestras se encuentran en los métodos 14 y 15 respectivamente.

**Sacarosa:** Se obtuvieron lisados claros a partir de 30 ml decultivos de las cepas seleccionadas, de la misma manera que en los experimentos de complejo de relajación (método 12), pero se adicionó solamente la mitad del volumen de todas las soluciones, para concentrar un poco la muestra. 300  $\mu$ l de los lisados claros se aplicaron a gradientes neutros de sacarosa del 5% - 20% o del 20% - 31%, que tuvieron una concentración de NaCl, de 0.05 M o 0.5 M. La ultracentrifugación se realizó con las mismas condiciones de los gradientes analíticos; el fraccionamiento y procesamiento de las muestras se describe en el método 14.

#### 14.- COLECCION DE FRACCIONES DE GRADIENTES.

Al término de la ultracentrifugación, los gradientes se colocaron en un dispositivo con una aguja hueca, y fueron perforados por la base. Los gradientes analíticos se colectaron directamente sobre cuadros de papel Whatman, con los cuales se determinó la radiactividad de las fracciones (método 7), y se obtuvo el perfil del gradiente. Para los gradientes analíticos de CsCl-EtBr se colectaron 10 gotas por fracción, y para los de sacarosa, 15 gotas por fracción. En el caso de los gradientes preparativos, las fracciones fueron colectadas en cajas de microtitulo (15 gotas/pozo) y se aplicaron alícuotas (10  $\mu$ l) de cada pozo a papeles; éstos se procesaron y se contaron (método 7) obteniéndose el perfil de cuentas del DNA de plásmido y del cromosómico.

Cuando se emplearon gradientes preparativos de sacarosa, las fracciones contenidas en el región del DNA del plásmido de interés, fueron transferidas de la caja de microtitulo a un tubo de polipropileno, y alícuotas de ésta solución (100  $\mu$ l-150  $\mu$ l) fueron aplicadas a gradientes de velocidad de sedimentación para su análisis.

15.- CONCENTRACION DE MUESTRAS PROVENIENTES DE GRADIENTES PREPARATIVOS DE CsCl-EtBr.

Con el perfil de cuentas determinado con las alícuotas de las fracciones del gradiente (método anterior), se identificaron las fracciones de interés (las contenidas en el pico de DNA de plásmido y en ocasiones las del DNA cromosómico); estas fracciones fueron transferidas de los pozos de las cajas de microtítulo a un tubo corex siliconizado, y se procesaron de la siguiente manera: se midió el volumen contenido en el tubo, y se añadió un volumen de 2-propanol saturado con CsCl (CsCl 10.65 gr, TES 12.3 ml, 2-propanol 15 ml). Las fases se mezclaron por inversión con parafilm y se incubó unos minutos en hielo. Posteriormente se descartó la fase superior (isopropanol con EtBr), y se repitió tres veces más el procedimiento de extracción, o las veces necesarias para conseguir una fase de DNA (inferior) totalmente incolora. Se añadieron: 2 volúmenes de TES, 0.3 volúmenes de acetato de sodio (3M pH 6.0), y 6 volúmenes de etanol absoluto (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). La solución fue incubada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 18 hrs, y el DNA precipitado, fue recuperado por centrifugación (Sorvall, rotor HB-4) a 10.000 rpm por 20 min a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Se recuperaron las pastillas, mismas que fueron secadas al aire, se resuspendieron en un volumen pequeño de 0.1 x TES, y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

16.- AISLAMIENTO DE pYK007 POR EL METODO DE NITROCELULOSA (121).

El DNA de pYK007, fue aislado a partir de 5 o 10 litros para cada experimento de hibridización empleando la técnica que se describe a continuación, y que fue desarrollada en este laboratorio. El procedimiento utilizado es una adaptación del minimétodo previamente descrito, modificando los volúmenes. La composición de las soluciones comunes, se encuentra en dicho minimétodo (sección 5).

Para un litro de cultivo: un cultivo crecido durante la noche, fué diluido 1:20 en medio L e incubado a 37°C, hasta que las células llegaron a 100 U.K.; éstas fueron divididas en fracciones de 125ml por tubo (corex) y se centrifugaron (25 ml a la vez) a 10,000 rpm por 5 min (a menos que se indique, en éste y en los pasos subsecuentes, se usaron el rotor SS-34 y la centrifuga Sorvall). Las pastillas fueron transferidas a un baño de hielo, lavadas con 25 ml de TES frío y resuspendidas en 2 ml de sacarosa. A cada tubo se agregó: 0.4 ml de lisozima y 0.8 ml EDTA, incubando 5 min después de las adiciones, y 1 ml de mezcla lítica (mezclando suavemente cada 0.1 ml). Transcurridos 15 min, se añadieron: 0.8 ml de NaCl y se incubó por 5 min, 2 ml de agua destilada estéril, y 1.5 ml de pronasa (predigerida, 15 min a 37°C), incubando a 37°C durante 15 min. Hasta este punto, el volumen en cada tubo fué aproximadamente de 8.5 ml, y el resto del procedimiento se efectuó a temperatura ambiente. Se añadió 1 volumen de fenol y 0.5 volúmenes de cloroformo 8.5 ml incubando por 15 min con rotación, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, y se extrajo la fase acuosa (superior) transfiriendola a tubos limpios. Esta fase se extrajo repetidamente con éter invirtiendo y centrifugando a cada extracción, hasta que las interfases se vieron claras. El contenido de los tubos fué vertido a un vaso de precipitados (dado que era la misma muestra) y se llevó a pH 12.0. Transcurridos 30 min a 37°C la solución se ajustó a un pH de 8.0 con Tris-HCl (2 M), y se dividió equitativamente en tubos corex; a cada tubo se agregó 1 gr de nitrocelulosa por ml de solución, y se dejó rotando por 15 min. Las muestras se centrifugaron para bajar la nitrocelulosa y se transfirieron a tubos corex limpios. Se adicionaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol absoluto (a -20°C), incubandose a -20°C durante la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm, durante 30 min a -20°C, se descartó el sobrenadante, y se secaron las pastillas y las paredes de los tubos. La pastilla de un tubo se resuspendió en 50 µl de TES, y la misma solución se pasó por todos los tubos resuspendiendo las

pastillas; este proceso se repitió 3 veces y finalmente la solución de 200  $\mu$ l aproximadamente, fué transferida a un tubo eppendorf y almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 17.- INMOVILIZACION DE DNA EN FILTROS DE NITROCELULOSA (42).

En principio, filtros de nitrocelulosa (Schleicher y Schüll, 0.45  $\mu$  de poro, 25 mm de diámetro) fueron sumergidos en 6 x SSC durante 2 hr, descartándose aquellos filtros que no se humedecieron homogénea y rápidamente. Por otro lado, muestras de DNA en 0.1 x SSC (o diluidas 1:10 en este amortiguador), fueron desnaturalizadas por ebullición durante 10 min, y transferidas rápidamente a un baño de hielo, en donde, se les agregaron 5 ml de 6 x SSC frío. Los filtros pretratados se colocaron en un aparato de filtración y cada filtro se lavó con 25 ml de 6 x SSC frío; posteriormente, las muestras de DNA desnaturalizadas fueron filtradas muy lentamente (en el caso de los blancos se filtró 6 x SSC), y los filtros se lavaron pasando de nuevo 25 ml de 6 x SSC frío. Al término de la filtración, los filtros se colocaron sobre papel Whatman (1 MM), se secaron al aire durante 1 hr, y se transfirieron a cajas petri cuyo fondo estaba cubierto con papel Whatman. Los filtros así tratados, fueron almacenados en un desecador al vacío, a temperatura ambiente (máximo un mes). Antes de su uso, los filtros fueron incubados en un horno al vacío, a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 2 hr; al finalizar la incubación, se marcaron, se transfirieron a viales de centelleo (máximo 4 filtros por vial). Las hibridizaciones se efectuaron en éstos viales como se describe en la sección 18.

#### 18.- HIBRIDIZACION DE DNA (42).

Cultivos de las cepas se marcaron con  $^3\text{H}$ -timidina como se describe en el método 9. Cuando los cultivos llegaron a una D.O. de 100 U.K., se tomaron alícuotas para determinar la actividad específica (de acuerdo a los métodos 7 y 20a) y se detuvo la

incorporación añadiendo 5 volúmenes de TSE-2/KCN frío. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 4°C, 6,000 rpm por 10 min (Sorvall, rotor SS-34), se resuspendieron en 1 volumen de TSE-2/KCN frío, y se colocaron en un baño de hielo (cuando las células no se usaron el mismo día, se congelaron y almacenaron a -20°C). 1 ml de la suspensión de células en TSE-2/KCN (para cada cepa) se transfirió a un tubo de centrifuga y se cosecharon centrifugando a 10,000 x g durante 10 min. Cada tubo se resupendió en 0.5 ml de TSE-2/ KCN, se agregó 0.5 ml de NaOH (1 N preparada antes de usar) y las muestras se incubaron 10 min a ebullición. Se añadió en este orden: 0.5 ml de HCl (1 N), 0.1 ml de Tris (1 M pH 7.0), 0.5 ml de 16 x SSC y 2.1 ml de formamida recristalizada (antes de usar, ver al final de este método); los tubos se taparon con parafilm y la solución se mezcló por inversión. 2 ml de estas soluciones de hibridización, fueron agregados a viales de centelleo conteniendo filtros de nitrocelulosa con DNA y blancos, y se tomaron alícuotas (50 µl y 100 µl) para determinar la cantidad de cuentas añadidas en la hibridización. La hibridización se llevó a cabo incubando los viales a 42°C en un baño con agitación suave (Gyratory Shaker G-10, New Brunswick Co.) por 5 días. Al término de la incubación, se sacaron los filtros de los viales transfiriendolos a un vaso de precipitados y se lavaron con agitación moderada a temperatura ambiente con 200 ml de las siguientes soluciones (para 20 y 30 filtros): 2 x SSC (en formamida al 50 %) incubando durante 30 min, se repitió una vez mas con una incubación de 20 min, 2 x SSC por 20 min, y 0.2 x SSC durante 20 min. Los filtros fueron secados en un horno a 70°C por 10 min, y transferidos a viales de centelleo con Tolueno-PPO para determinar la cantidad de cuentas hibridizadas a los filtros.

**Recristalización de Formamida:** 10 ml de una solución de formamida (Merck) fueron incubados a -20°C en un vaso de precipitados; cuando la solución estuvo congelada, se trituró, y los fragmentos generados se agregaron a una solución de formamida (30 a 60 ml) preincubada 1 hr en baño de hielo. Transcurridos 30 min,

se obtuvo cristalización del 50 % de la solución de formamida; ésta se recuperó decantando la solución no cristalizada, y fundiendo la cristalizada a 37°C. Una vez fundida, se dejó equilibrar con la temperatura ambiental, y se agregó a la mezcla de hibridización.

19.- ENSAYO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE ST (33) Y SONICACIÓN.

Sobrenadantes obtenidos por centrifugación de cultivos en medio T y sonicados de las cepas estudiadas en este trabajo, fueron ensayados para actividad de ST con el método descrito por Dean (9) modificado como se describe a continuación. A muestras de 1 ml (directas o diluciones en PBS), se añadieron dos gotas de Azul de Evans al 2 %, y cada muestra se inyectó intragástricamente a 4 ratones (0.1 ml/ratón) suizos albinos (NMR-1), de 3 a 4 días de edad. Transcurridas 4 hr de incubación a temperatura ambiente, los ratones fueron sacrificados por exposición a vapores de cloroformo. De cada grupo de 4 ratones se obtuvieron los intestinos, se juntaron y se pesaron, haciendo lo mismo con los cuerpos. La relación del peso de los intestinos y el peso de los cuerpos fué determinada, considerándose positiva cuando la relación fué  $\geq 0.080$ . Los ratones que no presentaron colorante en el estómago o que tuvieron colorante en la cavidad peritoneal fueron descartados.

Los experimentos de ultrasonificación (desintegrador MSE 150-W ultrasonic MK2, equipado con una punta de titanio de 9.5 mm de diámetro) se realizaron a 4°C, sumirgiendo las muestras en baño de hielo. La sonicación se llevó a cabo por pulsos de 15 seg con intervalos de 30 seg de descanso en una posición de 13  $\mu$ .

20.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE DNA Y DE PROTEINAS.

a) METODO DE DIFENILAMINA (19) para DNA. Sensibilidad 30-150  $\mu\text{g}$

A 1 ml de NaOH (5 mM) se agregaron 2 mg de DNA (de timo de cabra), se disolvieron, y se adicionó 1 ml de HCl (5 mM); con la solución resultante se preparó una solución patrón de DNA (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ), y a partir de ésta se construyó una curva standard de 30 - 150  $\mu\text{g}$  (0.1 ml - 0.5 ml), en incrementos de 30 $\mu\text{g}$ . Los tubos con la solución de DNA correspondientes a la curva y las muestras problema fueron aforadas a 0.5 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  (por duplicado). A cada tubo se agregaron 0.5 ml de  $\text{HClO}_4$  (1 M), y despues de una incubación a 70°C por 15 min de estas mezclas, se les adicionó 1 ml de Reactivo de Difenilamina. Transcurridos 15 min de incubación a ebullició , los tubos fueron enfriados, y se les determinó la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (Fotómetro Espectral PMQII, Carl Zeiss).

Reactivo de Difenilamina: se disolvieron 1.5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial, y se agregaron 1.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (se conservó en ausencia de luz); por cada 20 ml de ésta solución, se adicionaron 0.1 ml de acetaldehído al 1.6 % (1.0 ml de acetaldehído comercial frio se añadieron a 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ) justamente antes de usarse.

b) METODO DE DABA (125) para DNA. Sensibilidad 0.1-10  $\mu\text{g}$

Se preparó una solución patrón de DNA (de timo de cabra, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) como se describe en el método anterior, y con ésta, se construyó una curva standard de 0.1  $\mu\text{g}$  a 10  $\mu\text{g}$  (2  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$ ) aforando a un volúmen final de 200  $\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  (en tubos de vidrio siliconizados). A la curva standard y las muestras problema en 200  $\mu\text{l}$ , se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de una solución de DABA purificado (400  $\text{mg}/\text{ml}$ ), y se incubó a 60°C para evaporarlas. Los tubos se enfria-

ron y se agregaron 1.6 ml de HCl (1 M), agitando hasta disolver el precipitado. Las muestras fueron leídas en un fluorómetro contra un blanco de HCl, exitando a una longitud de onda de 405 nm y determinando la emisión a 505 nm.

**Purificación de DABA:** 40 g de DABA comercial fueron disueltos en 200 ml de HCl (4 N, calentando). Se añadió Norit A (1 g), y la mezcla fué centrifugada a 10,000 rpm por 10 min (Sorvall, rotor SS-34) para eliminar el carbón. Se recuperó el sobrenadante y se repitió la extracción dos veces mas; el último sobrenadante fué filtrado através de papel (Whatman 3MM), obteniéndose una solución incolora. Se añadió un volumen de HCl concentrado, y el DABA precipitado se colectó en un embudo de vidrio poroso (sintered glass, Millipore) filtrando la solución al vacío. El precipitado fué disuelto en 200 ml de agua destilada, recristalizado nuevamente agregando HCl concentrado (1 l), y filtrado en embudo de vidrio poroso. Los cristales retenidos fueron transferidos a un vaso de precipitados e incubados a 50°C en un horno al vacío para evaporar residuos de HCl. Finalmente, los cristales secos de DABA fueron depositados en viales de vidrio (en porciones pequeñas), sellados con parafilm, cubiertos con papel aluminio, y almacenados a -20°C.

c) DETERMINACION DE DNA POR DIFENILAMINA Y DABA CON MUESTRAS TRATADAS CON TCA.

Para la determinación de DNA con muestras en soluciones que pudieran interferir significativamente en los ensayos previamente descritos, las muestras y las curvas standard se precipitaron con TCA de la siguiente manera: empleando tubos de centrifuga se elaboró la curva patrón conteniendo la misma mezcla de solución de las muestras, y se aforaron todos los tubos a un volumen arbitrario, cercano al volumen requerido del ensayo seleccionado. A cada tubo, se agregó un volumen de TCA al 10% frío, se incubó en baño de hielo por 20 min, y el precipitado se colectó por centrifugación a 10,000 rpm, por 15 min a 4°C (Sorvall, SS-34). Se recu-

peró la pastilla y se lavó con un volúmen de etanol al 95% frío; finalmente, después de centrifugar, las pastillas se secaron, y se resuspendieron en 0.5 ml o 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O para la determinación de DNA por difenilamina o DABA, respectivamente.

d) DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BIURET  
Y DE LOWRY.

Los métodos estan descritos en las referencias 48 y 75 respectivamente.

21.- REACTIVOS.

Algunos de los reactivos empleados en este trabajo, fueron obtenidos de los siguientes proveedores: Agarosa y Azul de Bromofenol (Bio Rad Laboratories); SDS (BDH); triptona, casaminoácidos y extracto de levadura (Difco); Azul de Evans, sacarosa y formamida (Merck); AMPc, tritón x-100, reactivo de folin, difenilamina, deoxiguanosina, timina, y DNA de timo de cabra (Sigma Chemicals, Co.); RNasa y EtBr (Calbiochem), Nitrocelulosa (Comercial Mexicana de Pinturas, S.A.); CsCl (Kerr Mc-Gee Chemical Corp.). El resto de los reactivos fueron de grado analítico, generalmente obtenidos de Merck, Fisher y Mallinkrodt.

La <sup>3</sup>H-timidina (Actividad específica de 5 Ci/mmol), <sup>14</sup>C-timina (Actividad específica de 1 Ci/mmol) y PPO fueron obtenidos de New England Nuclear Biolabs.

**RESULTADOS:****I. EFECTO DE LAS DELECCIONES EN *cya* Y *crp* SOBRE EL NUMERO DE COPIAS DEL PLASMIDO pYK007.**

- 1) Determinación del número de copias de pYK007 mediante el empleo de gradientes de CsCl-EtBr.

El primer método que se usó para definir el número de copias del plásmido pYK007 en las cepas silvestre y deficientes en represión catabólica, fué la separación y cuantificación del DNA superhelicoidal y cromosómico en gradientes de CsCl-EtBr a partir de lisados crudos. Una breve descripción de la base teórica del empleo de esta técnica se encuentra en la introducción.

Como pasos preliminares a la elaboración de los gradientes de CsCl-EtBr, se efectuaron varios experimentos control, para establecer condiciones adecuadas, de incorporación de los precursores radiactivos de DNA (iii) y de contéo (apéndice); para corroborar la presencia de pYK007 en las cepas estudiadas (i), y determinar el peso molecular de pYK007 (ii) que se utilizó en el cálculo del número de copias.

- i) Comprobación de la presencia de pYK007 en la cepa silvestre y las mutantes deficientes en represión catabólica, en gel de agarosa.

El hecho de que las cepas silvestres (CA8000 y J54), *cya*<sup>Δ</sup> (CA8306), *cya*<sup>Δ</sup> *crp*<sup>Δ</sup> (CA8445), (descritas en materiales y métodos) adquiriesen resistencia a ampicilina y la habilidad de producir toxina, en experimentos de conjugación (80), implica la presencia del plásmido pYK007 en estas cepas, mas aún, en la introducción se describieron experimentos que muestran la estabilidad de la fre-

cuencia de transferencia, y la integridad de dicho plásmido; no obstante, estas evidencias no descartan la posibilidad de que las cepas albergen mas de un elemento extracromosomal.

Con la finalidad de visualizar los plásmidos presentes en las cepas en estudio, y observar si existe alguna diferencia en el tamaño de éste en las cepas  $cya^{\Delta}$  o  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$  con respecto a la silvestre, y si pYK007 es el único huésped en las cepas, se aisló DNA de plásmido de las cepas con pYK007 o pYK008 incluyendo la cepa 78-IEC como control, por el minimétodo de nitrocelulosa, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Después de 6 horas de corrida el gel fué teñido con EtBr, y fotografiado bajo luz ultravioleta.

En la figura 2 se muestra el diagrama de la fotografía obtenida del experimento antes descrito; se observa la presencia de una sola banda de DNA de plásmido, con una movilidad similar tanto en las cepas que contienen pYK007 como en la que tiene pYK008, y que corre como una especie de alto peso molecular con referencia a los plásmidos control de la cepa 78-IEC.

Datos preliminares obtenidos en este laboratorio indicaban que el peso molecular del pYK007 en cepas clinicas se encontraba en un rango de 75 y 85 megadaltones (J. Kupersztoch. Comunicación personal), lo cual, está en acuerdo con el alto peso molecular obtenido para la banda de plasmido observada en el experimento anterior; por lo tanto, tomando en cuenta estos resultados y el hecho de que las cepas producen toxina y son resistentes a ampicilina, se puede inferir que: hay sólo un plásmido en las cepas silvestre y las mutantes, y éste plásmido es pYK007.

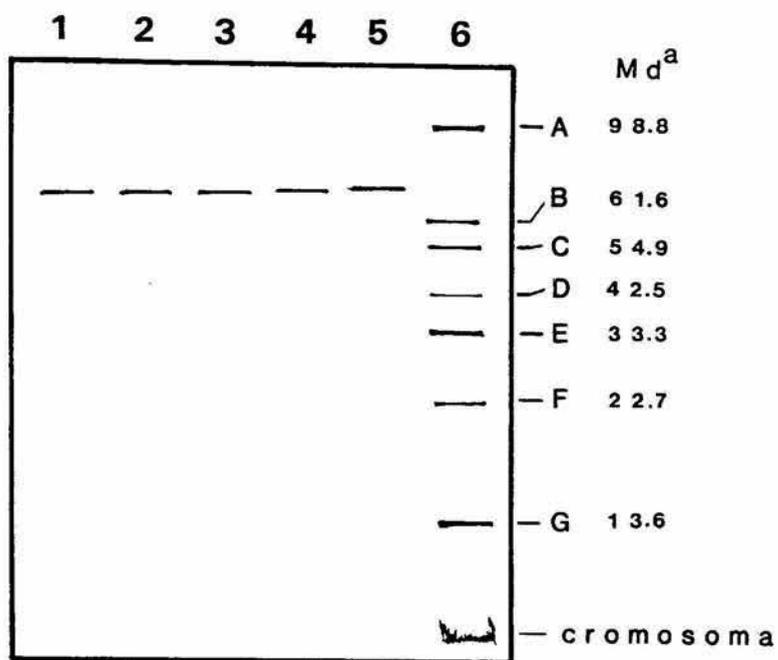
La cepa J54 con el pYK007 o pYK008 ( $Ap^r$   $ST^-$ ), fueron incluídas en éste trabajo, porque resultaba muy interesante el caracterizar el pYK008 al mismo tiempo que pYK007, ya que el primero es una revertante  $ST^-$  del segundo, pero no se sabe si la mutación

**FIGURA 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de lisados tratados con nitrocelulosa, de las cepas en estudio con pYK007 o pYK008.

Tres mililitros de cultivos crecidos hasta 100 U.K. fueron lisados y tratados por el minimétodo de nitrocelulosa como se describe en materiales y métodos. Los lisados fueron sometidos a electroforesis en gel vertical de agarosa al 0.7% y corridos durante 6 hrs a 125 volts (ver sección 6 de materiales y métodos), despues de las cuales el gel fué teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta. Carril 1: CA8000 (pYK007); carril 2: CA8306 (pYK007); carril 3: CA8445 (pYK007); carril 4: J54 (pYK008); carril 5: J54 (pYK007); carril 6: 78-IEC. Las letras en el margen derecho del gel, correponden a los diferentes plásmidos de la cepa 78-IEC incluidos como marcadores de peso molecular.

<sup>a</sup>: Pesos moleculares determinados con la curva de calibración del experimento subsecuente (figura 4).

**NOTA:** En esta figura se presenta un diagrama en lugar de la fotografía, porque el negativo no se conservó adecuadamente.



ST<sup>-</sup> se encuentra realmente en el gene ST. De ser mapeada la mutación, tanto si mapea dentro del gene ST, o fuera de éste, habilitaría la posibilidad de explorar si el plásmido codifica para algún elemento regulador de ST, no contenido en el mismo gene. La cepa J54 (pYK007) además de ser un control para la cepa J54 (pYK008), proporciona otro fondo genético silvestre cya+ crp+.

#### ii) Determinación del peso molecular de pYK007 y pYK008.

Como se refirió anteriormente, observaciones preliminares en este laboratorio, indicaban que el pYK007 tenía un peso molecular entre 75 y 85 megadaltones, y también se conocían valores aproximados para los pesos moleculares de los plásmidos de la cepa 78-IEC; no obstante, no se habían hecho curvas de calibración para estos plásmidos. En virtud, de que para el cálculo de número de copias del pYK007, a partir de los porcentajes de DNA superhelicoidal, es necesario conocer el peso molecular de dicho plásmido, se decidió elaborar curvas de calibración de peso molecular para la cepa 78-IEC y para el pYK007, en un afán de obtener un valor más preciso para el P.M. de pYK007. Por otro lado, la determinación de el P.M. de los plásmidos de la 78-IEC es muy útil, porque posee plásmidos de un amplio rango de tamaño, lo cual, reduce el número de cepas con plásmidos marcadores a una cepa.

La movilidad de la estructura superhelicoidal de los plásmidos en geles de agarosa al 0.7% es inversamente proporcional a su peso molecular (83), esto es, mientras más grande es el plásmido, más lenta es su migración en el gel; por lo tanto, es posible saber el peso molecular de un plásmido particular, determinando la migración relativa de éste y de plásmidos de peso molecular conocido incluidos como marcadores, en geles de agarosa. Con los datos obtenidos se grafica el logaritmo del P.M. contra el logaritmo de la migración relativa, obteniéndose una recta, y con la expresión matemática de ésta, se calcula el valor del plásmido en cuestión.

Previa a la determinación del peso molecular de pYK007, se obtuvo la curva de calibración de los plásmidos de la cepa 78-IEC, a partir de geles de agarosa en los que se incluyeron plásmidos control de P.M. conocido, de 166.0 Md, a 26.0 Md (figura 2).

El negativo del gel de la figura 3 fué amplificado por proyección (para reducir el error standard de la medición); a partir del origen del gel, fueron determinadas las migraciones relativas de los plásmidos usados como control de P.M., y de los plásmidos de la cepa 78-IEC. Con los datos de P.M. de los plasmidos control (fig. 3) y el logaritmo de la migración relativa de éstos, se trazó la curva de la fig. 4 por el método de mínimos cuadrados y se determinó coeficiente de correlación, que fué de  $-0.9876$ . El cálculo de los pesos moleculares de los plásmidos A a G de la 78-IEC se hizo interpolando los valores del log. de la migración relativa en la ecuación de la recta encontrada y se listan en la fig. 3. Cabe mencionar, que los valores finales de peso molecular para los plasmidos de la 78-IEC, fueron obtenidos del promedio de 4 perfiles diferentes de dos geles independientes.

Para la determinación del P.M. de pYK007 y pYK008 se siguió el procedimiento previamente descrito. En éste caso se midieron las movilidades relativas del pYK007, pYK008 y los plásmidos de la 78-IEC en el negativo del gel de la figura 2; con estos datos, y los valores de P.M. de los plásmidos de la 78-IEC calculados anteriormente, se obtuvo la curva de calibración presentada en la figura 5, cuyo coeficiente de correlación es de  $-0.9678$ .

Empleando la expresión matemática de la recta de calibración de la figura 5 se calculó que el Peso Molecular promedio para el plásmido pYK007 es de  $77.6 \times 10^6$  daltones. Debido a que la movilidad del pYK007 fué igual a la del plásmido pYK008 se asumió que tienen el mismo peso molecular.

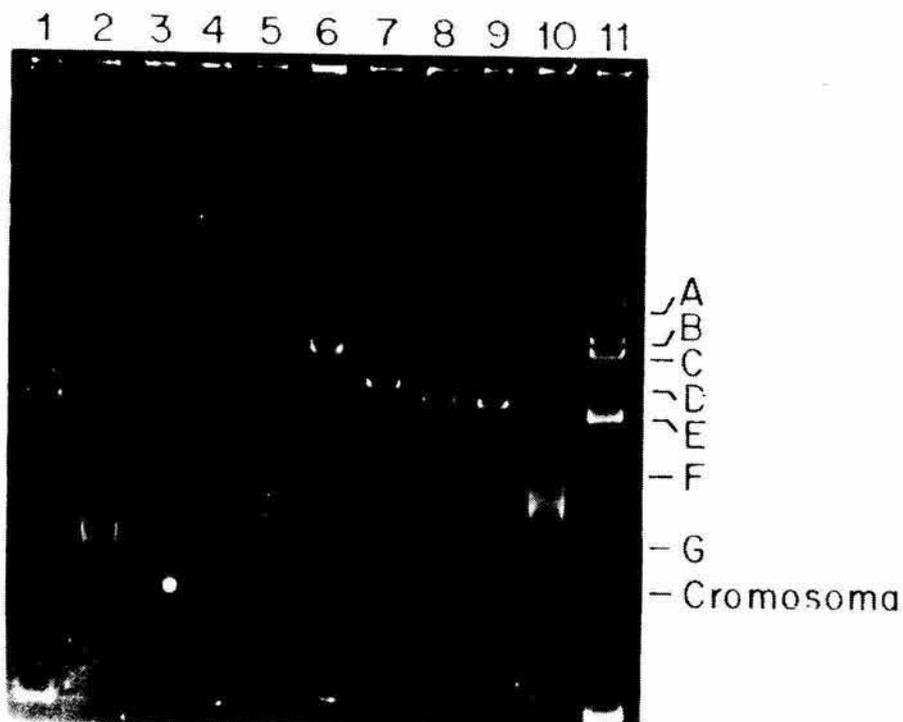
**FIGURA 3. Electroforesis en gel de agarosa de lisados de la cepa 78-IEC. y de cepas con plásmidos marcadores de peso molecular.**

Tres mililitros de los cultivos crecidos hasta 100 U.K. fueron lisados y tratados como se describe en materiales y métodos (sección 5); los lisados fueron sometidos a electroforesis en gel vertical de agarosa al 0.7% con amortiguador de Tris boratos y corridos por 6 hrs. (125 volts), despues de las cuales el gel fué teñido con EtBr y fotografiado bajo luz ultravioleta (como se indica en el método 6). Carriles 1 y 11 corresponden a la cepa 78-IEC; carriles 2-10, cepas que contienen plásmidos usados como marcadores de P.M., mismos que se indican en la tabla.

<sup>a</sup> El Peso Molecular de estos plásmidos estan reportados en la referencia 59.

<sup>b</sup> Los pesos moleculares de los plásmidos de la cepa 78-IEC, fueron calculados con la curva de calibración de la fig. 4.

El gel presentado fué realizado por Lourdes Cervantes en este laboratorio.



Carril	Plasmidos control	P.M. conocido <sup>a</sup> (10 <sup>-6</sup> daltones)	Plasmidos 78-IEC	P.M. calculado <sup>b</sup> (10 <sup>-6</sup> daltones)
2	478	166.0		
3	R27	112.0	A	98.8
4	RA1	86.0	B	61.6
5	R64	72.3	C	54.9
6	R1	62.0	D	42.5
7	R28K	44.0	E	33.3
8	RP4	36.0	F	22.7
9	N3	33.0	G	13.6
10	R6K	26.0		

FIGURA 4. Curva de calibración de Peso Molecular para los plásmidos de la cepa 78-IEC.

La curva se trazó con los datos extraídos del gel de agarosa de la figura 3, con el procedimiento descrito en el texto. La ecuación obtenida para la recta fué:  
 $y = 5.2354 + (-2.8029)x$ , con un coeficiente de correlación de  $-0.9876$ .

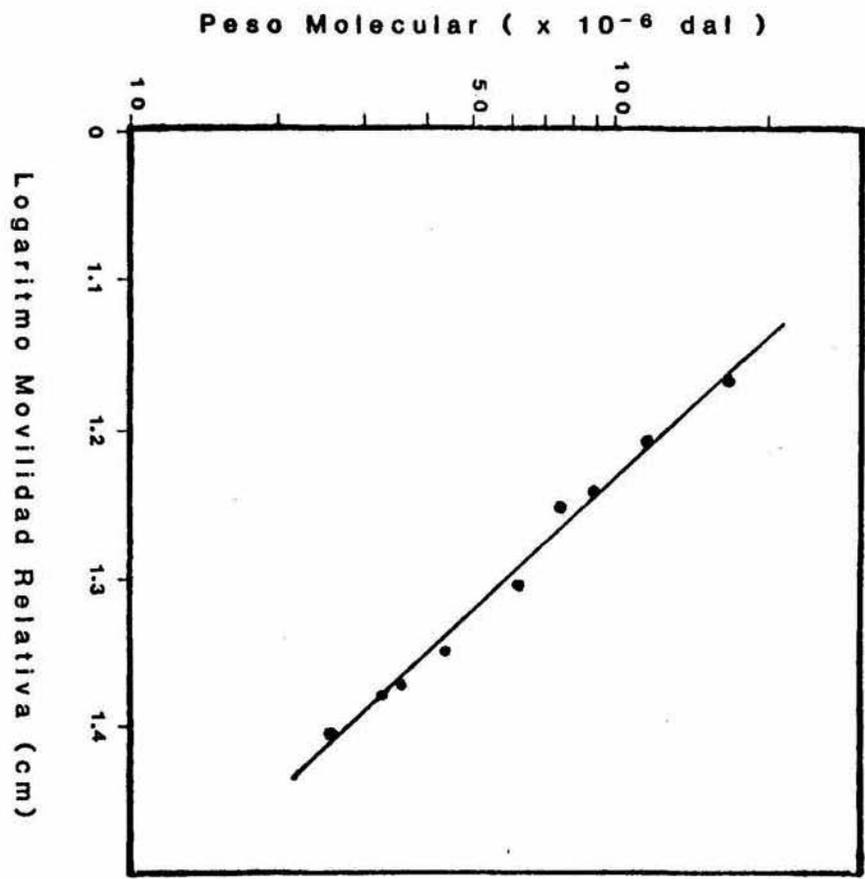
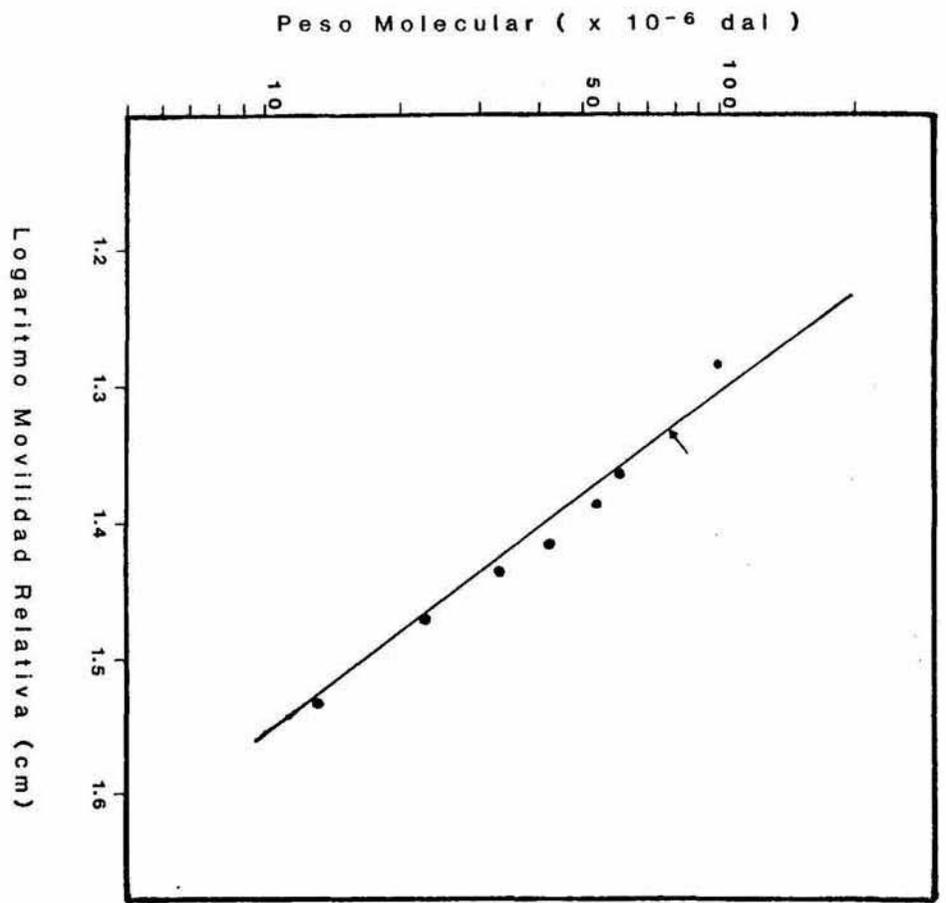


FIGURA 5. Curva de calibración de Peso Molecular para los plásmidos pYK007 y pYK008.

Los datos empleados en esta curva, fueron obtenidos a partir de el gel de agarosa de la figura 2, siguiendo el procedimiento descrito en el texto. La ecuación de la recta fué:  $y = 6.9878 + (-3.8319) x$ , con un coeficiente de correlación de -0.9678. El Peso Molecular promedio calculado para pYK007 y pYK008 fué igual a  $77.6 \times 10^6$  daltones.



iii) Cinética de incorporación de  $^3\text{H}$ -timina en presencia de deoxiadenosina a cultivos en fase exponencial.

El marcaje isotópico de DNA con  $^3\text{H}$ -timidina, fué realizado como se describe en (65) y se detalla en la sección 9 de materiales y métodos; en estos marcajes, se pulsó por 10 min, lo cual, es adecuado para timidina, ya que ésta puede ser incorporada eficientemente a DNA de cepas protótrofas de E. coli por periodos de 5-10 min. A tiempos mas largos, la incorporación es reducida por la acumulación de una fosforilasa inducida por la timidina misma, que rompe a ésta en timina mas deoxiribosa 1- fosfato (98,13).

En contraste con la timidina, la timina es muy pobremente incorporada por las cepas protótrofas mas usuales de E. coli (42a) y generalmente se requiere del empleo de mutantes auxótrofas a timina. Otra forma de aumentar la incorporación de timina, es la adición de ciertos nucleósidos o deoxinucleósidos al medio de cultivo bacteriano (16). Entre varios compuestos probados por Boyce y Setlow (16), la deoxiguanosina y deoxiadenosina (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) fueron los mas eficientes en el aumento de incorporación de timina a E. coli B, aunque, la deoxiadenosina fué tóxica para la cepa E. coli K-12 (16).

En base a lo anterior se realizaron cinéticas de incorporación de  $^3\text{H}$ -timina en presencia de deoxiadenosina, con el objeto de establecer condiciones de incorporación de timina a cultivos en fase exponencial que permitan la detección eficiente del DNA de los cultivos, en gradientes de  $\text{CsCl-EtBr}$ .

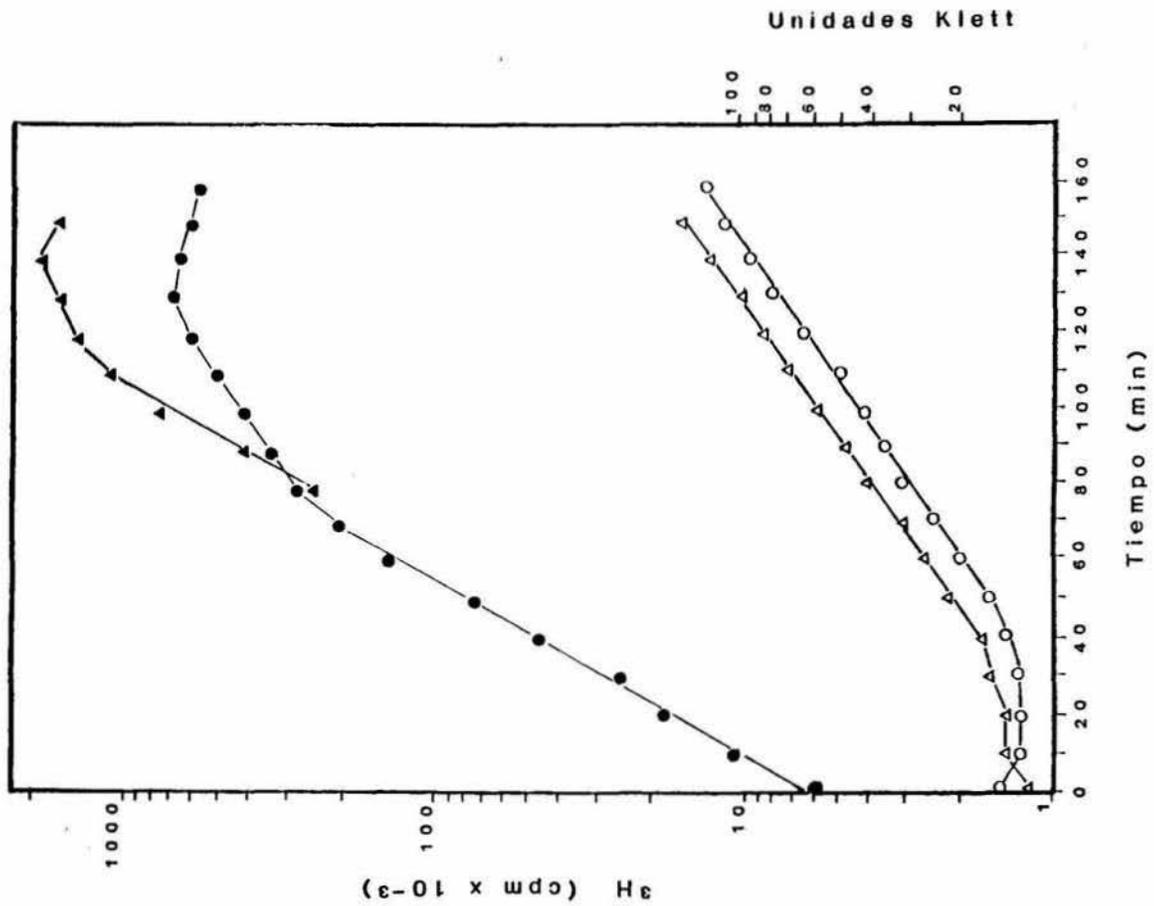
En la cinética de la figura 6, se observa que al adicionar deoxiadenosina y  $^3\text{H}$ -timina a los 70 min (30 U.K.) de crecimiento de un cultivo de la cepa J54 (pYK007) (triángulos cerrados), la incorporación de timina marcada es mas eficiente, que cuando se agregan deoxiadenosina y  $^3\text{H}$ -timina al tiempo cero de crecimiento (círculos cerrados), y se mantiene lineal hasta 110 min (75 U.K.);

FIGURA 6. Cinética de incorporación de  $^3\text{H}$ -timina a cultivos en fase exponencial, en presencia de deoxiadenosina.

Cultivos de la cepa J54 (pYK007) crecidos durante la noche fueron diluidos 1:50 en medio mínimo suplementado e incubados a  $37^\circ\text{C}$  con aeración hasta una densidad de 140 U.K. Deoxiadenosina ( $300\ \mu\text{g/ml}$ ) y  $^3\text{H}$ -timina ( $0.1\ \text{ml}/10\ \text{mls. de cultivo}$ ) fueron adicionadas al tiempo cero (círculos) o a 30 U.K. (triángulos). Alicuotas fueron tomadas a los tiempos indicados y se determinó la densidad óptica y la incorporación de la marca (como se describe en la sección 8 de materiales y métodos).

Adición de deoxiadenosina y  $^3\text{H}$ -timina al tiempo cero: densidad óptica (  $\circ$  ), incorporación de timina marcada (  $\bullet$  ).

Adición de deoxiadenosina y  $^3\text{H}$ -timina a 30 U.K.: densidad óptica (  $\Delta$  ), incorporación de la marca (  $\blacktriangle$  ).



además, en ninguno de los dos casos se observó un efecto tóxico, al menos, reflejado en el crecimiento bacteriano (círculos y triángulos abiertos).

La incorporación obtenida al adicionar timina marcada y deoxiadenosina cuando el cultivo llega a 30 U.K., es satisfactoria para el propósito arriba mencionado, por lo cual, se usaron estas condiciones de marcaje en experimentos subsecuentes, adicionando deoxiadenosina y  $^{14}\text{C}$ -timina a 40 U.K., para favorecer la incorporación a densidades ópticas mayores de 75 U.K.

En experimentos previos, se siguió la incorporación de  $^3\text{H}$ -timina a cultivos en presencia de deoxiadenosina o deoxiguanosina; se registró un crecimiento mas rápido en los cultivos con deoxiguanosina, sin embargo, la incorporación con deoxiadenosina fué mas eficiente, razón por la cual, la cinética se hizo en presencia de deoxiadenosina (datos no presentados).

iv) Estimación del porcentaje de DNA superhelicoidal de las cepas silvestre,  $\text{cya}^\Delta$  y  $\text{crp}^\Delta$ , con el plásmido pYK007.

Para detectar el DNA de pYK007 de las cepas en estudio, y separar la forma superhelicoidal del DNA cromosómico en gradientes de  $\text{CsCl-EtBr}$ , con el objeto de determinar el número de copias por equivalente genómico de pYK007, cultivos de las cepas CA8000 (pYK007), CA8306 (pYK007), CA8445 (pYK007), J54 (pYK007) y J54 (pYK008), fueron marcados con  $^3\text{H}$ -timidina (método 9) y mezclados con volúmenes iguales de un cultivo marcado con  $^{14}\text{C}$ -timina (método 10). Las mezclas de cultivos fueron lisadas, y los lisados crudos resultantes se sometieron a centrifugación en gradientes de  $\text{CsCl-EtBr}$  (7) (método 11). La inclusión de cultivos marcados con  $^{14}\text{C}$  (8), es conveniente, porque representa un control interno para la detección de la presencia de nucleasas que pudiesen afectar la recuperación del DNA.

Una vez efectuada la centrifugación, se visualizó el DNA separado en los gradientes irradiando a éstos con luz ultravioleta; se observaron claramente dos bandas bien separadas, la inferior correspondiente a DNA de plásmido CCC, y la superior conteniendo DNA cromosómico lineal y moléculas de plásmido circulares abiertas. Los gradientes se perforaron por la base, fraccionaron (método 14), y se determinó la radiactividad de las fracciones contando simultáneamente  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  (método 7 y apéndice).

Las cuentas por minuto obtenidas se corrigieron para fondos y para el porcentaje de cuentas de  $^3\text{H}$  (0.1 %) que fueron detectadas en el canal de  $^{14}\text{C}$ , así como las de  $^{14}\text{C}$  (10 %), que se contaron en el canal de  $^3\text{H}$  (apéndice). Finalmente, se multiplicaron por los factores de corrección (de eficiencia, ver apéndice) y con las cuentas obtenidas se elaboraron graficas de no. de fracción v.s. cuentas por minuto.

En la fig. 7 se muestra uno de los perfiles obtenidos en estos experimentos. Se observa el pico de DNA de plásmido superhelicoidal en la zona mas densa del gradiente, seguido por el pico de DNA cromosómico; en conjunto esta figura representa 1 experimento de un total de 5, y en todos ellos se observó una clara correlación de las cuentas de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , y reproducibilidad en los perfiles.

Para el cálculo del porcentaje de DNA superhelicoidal con respecto del cromosómico, se hizo la sumatoria de las cpm de las fracciones (previamente corregidas) contenidas en la región del plásmido, y la sumatoria de las del cromosómico, de las que se sustrajo a cada fracción el fondo del pico correspondiente. El DNA cromosómico fué considerado el 100%, y en relación a éste se determinó el porcentaje del plásmido. En la tabla 4, se encuentran los valores del porcentaje de DNA superhelicoidal con respecto del DNA cromosómico obtenidos del promedio de 5 experimentos independientes.

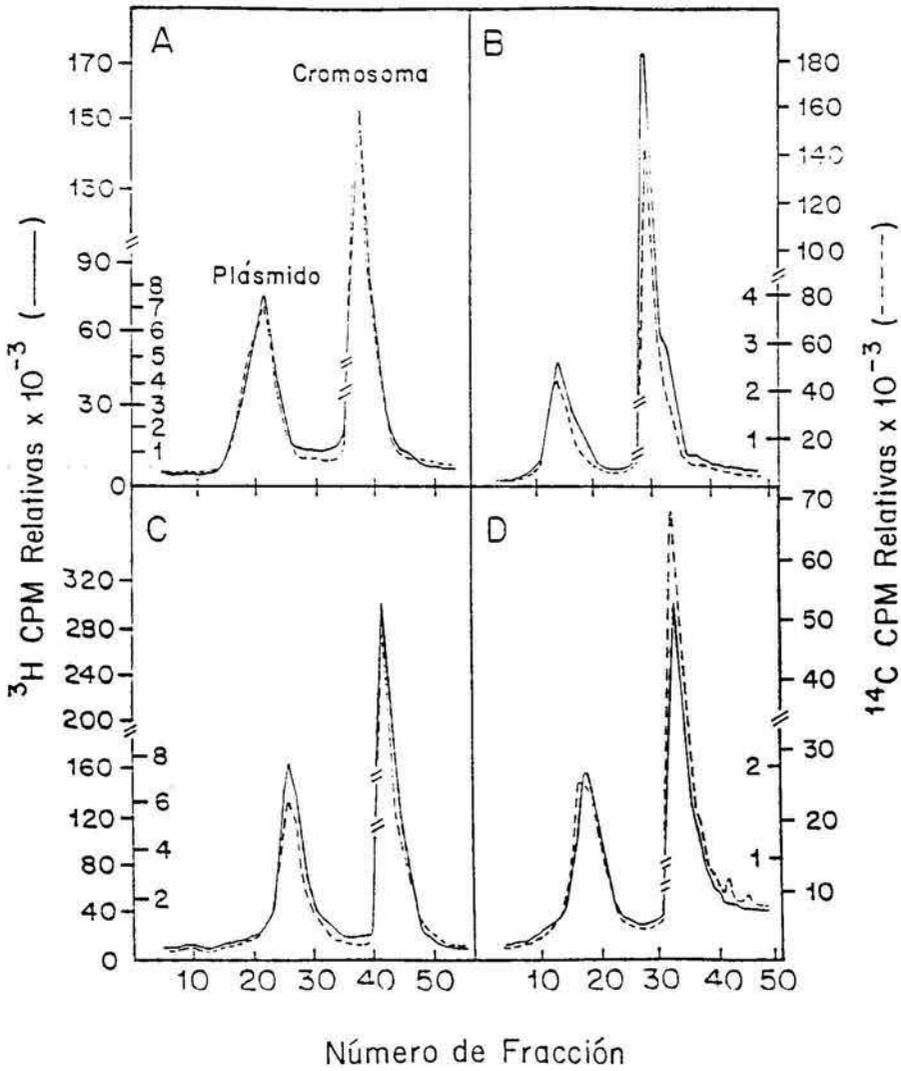
FIGURA 7. Perfiles de gradientes de CsCl-EtBr de lisados de las cepas empleadas en la cuantificación de DNA superhelicoidal de pYK007.

Cultivos en crecimiento exponencial de las cepas que se muestran en la figura, fueron marcados, lisados, sometidos a centrifugación en gradientes de CsCl-EtBr, fraccionados y contados como se indica en el texto, y en la sección 11 de materiales y métodos.

Los perfiles de  $^3\text{H}$  (——) corresponden a las cepas, A: CA8000 (pYK007); B: CA8306 (pYK007,  $\text{cya}^\Delta$ ); C: J54 (pYK007); y D: CA8445 (pYK007,  $\text{cya}^\Delta \text{crp}^\Delta$ ). Los perfiles del control interno de  $^{14}\text{C}$  (-----) pertenecen a la cepa J54 (pYK007). En la figura 7A se señalan las posiciones de la región correspondiente a DNA CCC de plásmido, y la que contiene DNA cromosómico y círculos abiertos del plásmido.

La escala de cuentas que se encuentra en el interior de las ordenadas pertenecen a los picos de plásmido, mientras en la región externa de la ordenada (al cambio de escala) se muestra la escala para los picos de cromosoma.

La cepa J54 (pYK008) se incluyó en todos los experimentos de cuantificación de DNA superhelicoidal (perfil no presentado en esta figura).



v) Número de copias de pYK007 y pYK008 (como DNA superhelicoidal) por equivalente genómico.

Tomando los porcentajes de DNA superhelicoidal de pYK007 en los diferentes fondos genéticos (tabla 4), para la determinación de número de copias, sólo restan unos cálculos; para ellos se utilizó como valor del peso molecular de pYK007,  $77.6 \times 10^6$  daltones (determinado en el inciso ii), y se asumió que el equivalente genómico de *E.coli* en las condiciones usadas es igual a uno, con un valor de  $2.5 \times 10^9$  daltones(24). Considerando un equivalente genómico como el 100%, se obtiene la fracción de peso molecular a la que corresponden los porcentajes de plásmido para cada cepa y con la fracción de peso molecular resultante, se determina la relación de ésta con respecto al peso molecular de pYK007, que será el número de copias de pYK007 para la cepa en cuestión (ver pie de página, tabla 4).

Los número de copias de pYK007 por equivalente genómico calculados, se encuentran en la tabla 4. En ésta se muestra que el número de copias de pYK007 en las cepas silvestre,  $cya^{\Delta}$ ,  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$  y J54 es muy similar, observándose de 1.0 a 1.7 copias por equivalente genómico en las diferentes cepas; ésto significa, que las cepas  $cya^{\Delta}$  y  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$  tienen un número de copias de pYK007 comparable a la cepa silvestre. En virtud de que la diferencia mayor en copias de pYK007 entre la cepa silvestre y las deficientes en represión catabólica no excede a una copia, mientras que la diferencia en actividad toxigénica en estas cepas fué de 100 veces, estos resultados indican que el efecto del AMPc observado en las cepas  $cya^{\Delta}$  y  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$  no se da como consecuencia de un cambio en el número de copias del plásmido pYK007 en estas cepas.

TABLA 4. Efecto de las mutaciones  $cya^{\Delta}$  y  $crp^{\Delta}$  sobre el número de copias de pYK007, determinado por gradientes de CsCl-EtBr.

Cepas	% de DNA de plásmido superhelicoidal <sup>a</sup>		DNA superhelicoidal por equivalente cromosómico <sup>b</sup>	
	[ <sup>3</sup> H] DNA	[ <sup>14</sup> C] DNA	[ <sup>3</sup> H] DNA	[ <sup>14</sup> C] DNA
CA8000 (PYK007)	3.1	5.5	1.0	1.7
CA8306 (PYK007)	3.3	4.7	1.0	1.4
CA8445 (PYK007)	5.4	6.3	1.7	2.0
J54 (PYK007)	5.1	5.5	1.6	1.7
J54 (PYK008)	3.4	6.9	1.0	2.1

<sup>a</sup> 5 ml de las cepas fueron crecidas en medio L hasta alcanzar una densidad de  $1 \times 10^8$  células/ml y fueron marcadas con <sup>3</sup>H-timidina (método 9). Simultáneamente, 30 ml de M9 suplementado fué inoculado con la cepa J54 (pYK007) y marcado con <sup>14</sup>C-timina (método 10); 5 ml de este cultivo fué adicionado a cada 5 ml de las diferentes cepas y se aisló el DNA de los lisados crudos (método 11). A partir de los lisados crudos, se elaboraron gradientes de CsCl-EtBr, se colectaron, se contaron, y gráficaron.

Con las cuentas obtenidas en la región de DNA superhelicoidal y cromosómico de los gradientes, se calculó el porcentaje de DNA superhelicoidal con respecto del DNA cromosómica con la siguiente relación:

$$\left( \frac{\text{cpm de la región de DNA de plásmido}}{\text{cpm de la región de DNA cromosómico}} \right) \times 100\% = \% \text{ de plásmido}$$

<sup>b</sup> El número de copias por equivalente cromosómico se determinó, empleando las siguientes relaciones:

$$a) \frac{(2.5 \times 10^9 \text{ dal}) \times (\% \text{ de plásmido, cepa X})}{100 \%} = \text{P.M. de la fracción de plásmido, cepa X}$$

$$b) \frac{\text{P.M. de la fracción de plásmido, cepa X}}{77.6 \times 10^6 \text{ dal}} = \text{no. de copias de pYK 007 por equivalente genómico, cepa X.}$$

en donde;

% de plasmido, cepa X = porcentajes de plásmidos determinados en para cada cepa (primera columna)

$77.6 \times 10^6$  dal = P.M. de pYK007 determinado en el inciso ii

$2.5 \times 10^9$  dal = valor promedio de un cromosoma de E. coli (se asumió que el equivalente genómico es de un cromosoma).

**vi) Complejo de relajación de pYK007 y determinación de un plásmido críptico en las cepas en estudio.**

En la introducción se mencionó que los plásmidos pueden existir como complejos DNA-proteína, denominados complejos de relajación, cuya propiedad es la conversión de la forma superhelicoidal del plásmido a una forma circular abierta (66). Estos complejos de relajación pueden ser aislados lisando bacterias con detergentes no iónicos; al tratar estos extractos con SDS (0.25 %) o EtBr (300 ug/ml) se induce la relajación del plásmido, pasando de la forma superhelicoidal a la forma circular abierta (66). Cuando se emplea un plásmido que presenta complejos de relajación, y se le somete a un procedimiento como el utilizado en la cuantificación del porcentaje de DNA superhelicoidal de pYK007 (método 11), estos complejos podrían relajarse durante la lisis o la centrifugación de los gradientes de CsCl-EtBr, dando como resultado círculos abiertos, que aparecen en la banda de DNA cromosómico de dichos gradientes; por lo tanto, se inició la examinación del complejo de relajación del pYK007 en los diferentes fondos genéticos, con el objeto de determinar si el plásmido existe en esta forma de complejo DNA-proteína,, y de ser así, si el porcentaje de éste pudiera afectar significativamente los valores de números de copias obtenidos.

Para detectar si el plásmido pYK007 posee complejos de relajación, cultivos de las cepas silvestre (pYK007) y la  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$  (pYK007) fueron marcados con  $^3H$ -timina, lisados y clarificados, como se indica en materiales y métodos. Los lisados claros obtenidos, se mezclaron con DNA superhelicoidal de pYK007 marcado con  $^{14}C$  y purificado (ver método 13); alícuotas de estas mezclas se trataron con SDS (0.25 %) y éstas, y los controles no tratados se analizaron en gradientes de velocidad de sedimentación (ver método 12). En gradientes de este tipo se pueden distinguir la forma superhelicoidal del plásmido con respecto de la relajada, debido a que los círculos abiertos (relajados), al perder su estructura su-

perhelicoidal se extienden, aumentando su coeficiente de fricción y disminuyendo el de sedimentación, lo que se traduce en un desplazamiento detectable del pico de DNA superhelicoidal, hacia la zona en la que migran las especies de menor coeficiente de sedimentación. Por otro lado, el DNA superhelicoidal de pYK007 marcado con  $C^{14}$  representa un control del plásmido libre de complejos.

Los resultados del análisis anterior (ver figura 8) muestran que efectivamente, el plasmido pYK007 existe como complejo de relajación en las cepas silvestre y  $cya^{\Delta}$   $crp^{\Delta}$ , evidenciado por el desplazamiento del pico de plasmido superhelicoidal marcado con  $^3H$  en presencia de SDS. El control interno marcado con  $^{14}C$  de DNA sin complejo de relajación, migró de la manera esperada, en la región superhelicoidal de plásmido, y no se desplaza en presencia de SDS, sin embargo se aprecia otro pico que no corresponde a la movilidad de la estructura relajada. Dado que el este DNA marcado con  $^{14}C$ , fué purificado en un gradiente preparativo de CsCl-EtBr, la presencia de el segundo pico podría explicarse como consecuencia de contaminación del plásmido con material cromosómico durante la colección del gradiente, o bien, por la presencia de otro elemento genético extracromosómico en esta cepa.

En experimentos subsecuentes similares al descrito, en varias ocasiones, se observó la presencia de un pico extra que no correspondía a la migración de ninguna de las dos formas del plasmido, pero ahora, en los lisados claros de las cepas del juego isogénico  $cya^{\Delta}$ ,  $crp^{\Delta}$ . De nuevo, el pico extra podía ser explicado por las razones expuestas previamente. Los intentos de purificar la especie superenrollada del plasmido pYK007 en gradientes preparativos de sacarosa (20 % a 31 %, NaCl 0.05 M) no fueron exitosos, ya que se seguía observando contaminación por una especie molecular distinta.

Como se mencionó anteriormente, una explicación alternativa a la contaminación cromosómica como la responsable de la especie ex-

FIGURA 8. Análisis del complejo de relajación de pYK007 en gradientes de velocidad de sedimentación.

Lisados claros de las cepas marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina fueron mezclados con DNA del plásmido pYK007 marcado con  $^{14}\text{C}$ -timina, purificado y libre de complejo de relajación, como se indica en el texto. Alícuotas de las mezclas fueron tratadas con SDS (0.25 %) y éstas, y los controles no tratados se aplicaron a gradientes de sacarosa de 5 % al 20 % (w/v) (1 M NaCl). La centrifugación y el fraccionamiento (colectando a partir de la base) se hicieron como se indica en materiales y métodos.

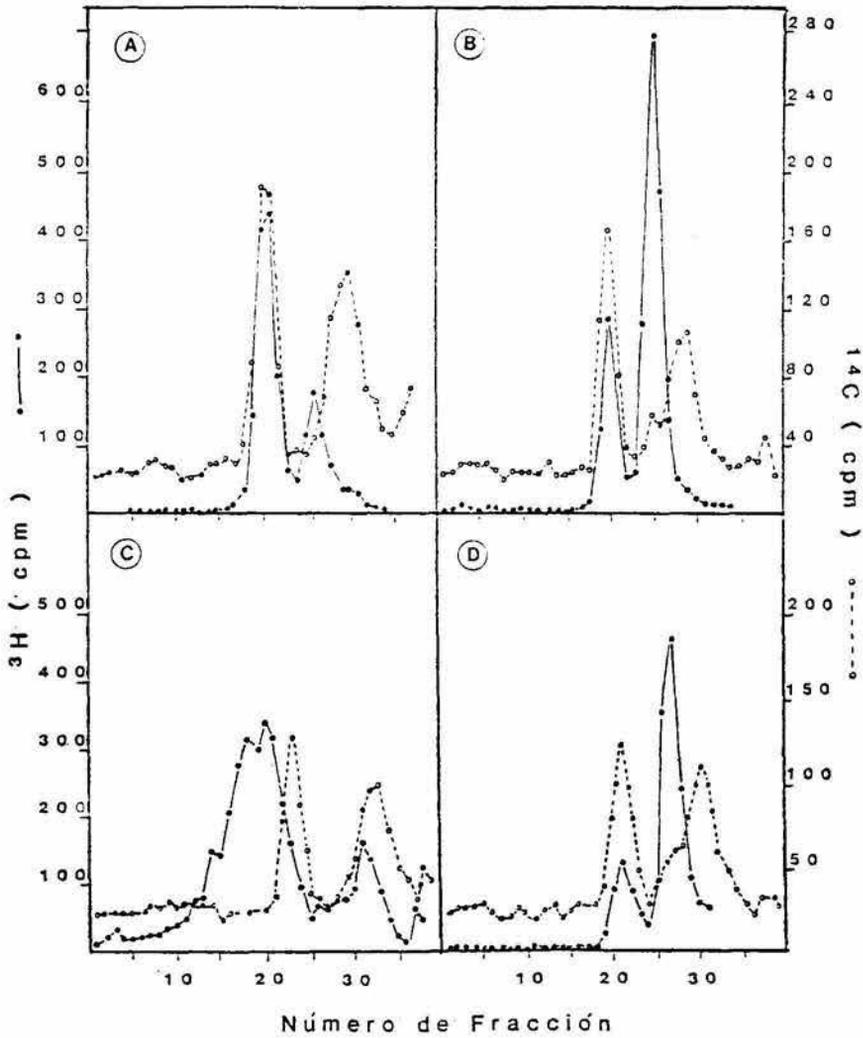
A.- muestra control (no tratada), del DNA obtenido de la cepa CA8000 (pYK007).

B.- muestra tratada con SDS, del DNA obtenido de la cepa CA8000 (pYK007).

C.- muestra control (no tratada), del DNA obtenido de la cepa CA8445 ( $\text{cya}^\Delta \text{crp}^\Delta$ ) (pYK007).

D.- muestra tratada con SDS, del DNA obtenido de la cepa CA8445 ( $\text{cya}^\Delta \text{crp}^\Delta$ ) (pYK007).

En todos los gradientes se empleó como marcador interno el DNA del plásmido pYK007 marcado con  $^{14}\text{C}$ .



tra, sería la presencia de un plásmido cuyo fenotipo no ha sido definido (críptico), a pesar de que en la figura 2 se observa solamente una banda de plásmido con la movilidad de pYK007. Se decidió analizar esta alternativa usando gradientes analíticos de CsCl-EtBr. Las cepas CA8000, CA8306, CA8443, y J54, (sin pYK007) se marcaron con  $^3\text{H}$ -timidina y se siguió el procedimiento descrito en materiales y métodos.

En la figura 9 se observa que aún cuando las cepas CA8000, CA8306 y CA8445, no tienen el plásmido pYK007, presentan claramente un pico de DNA superhelicoidal, lo cual indica que existe un plásmido críptico en estas cepas; dicho plásmido no se observa en la cepa J54. Cabe mencionar, que la banda de DNA de plásmido que normalmente se detecta en las cepas con pYK007, al irradiar con luz ultravioleta el DNA separado en el gradiente, no fué visible en las cepas sin el pYK007.

La presencia de un plásmido críptico no detectable por electroforesis en geles de agarosa en el juego isogénico  $\text{cya}^\Delta$ ,  $\text{crp}^\Delta$ , fué del todo inesperada, e implica que la cuantificación del plásmido pYK007 por el método de gradientes de CsCl- EtBr (sección 11 de materiales y métodos), en el que se determinaron las concentraciones relativas de DNA superhelicoidal, es inadecuada, por la contribución del plásmido críptico en su forma superenrollada.

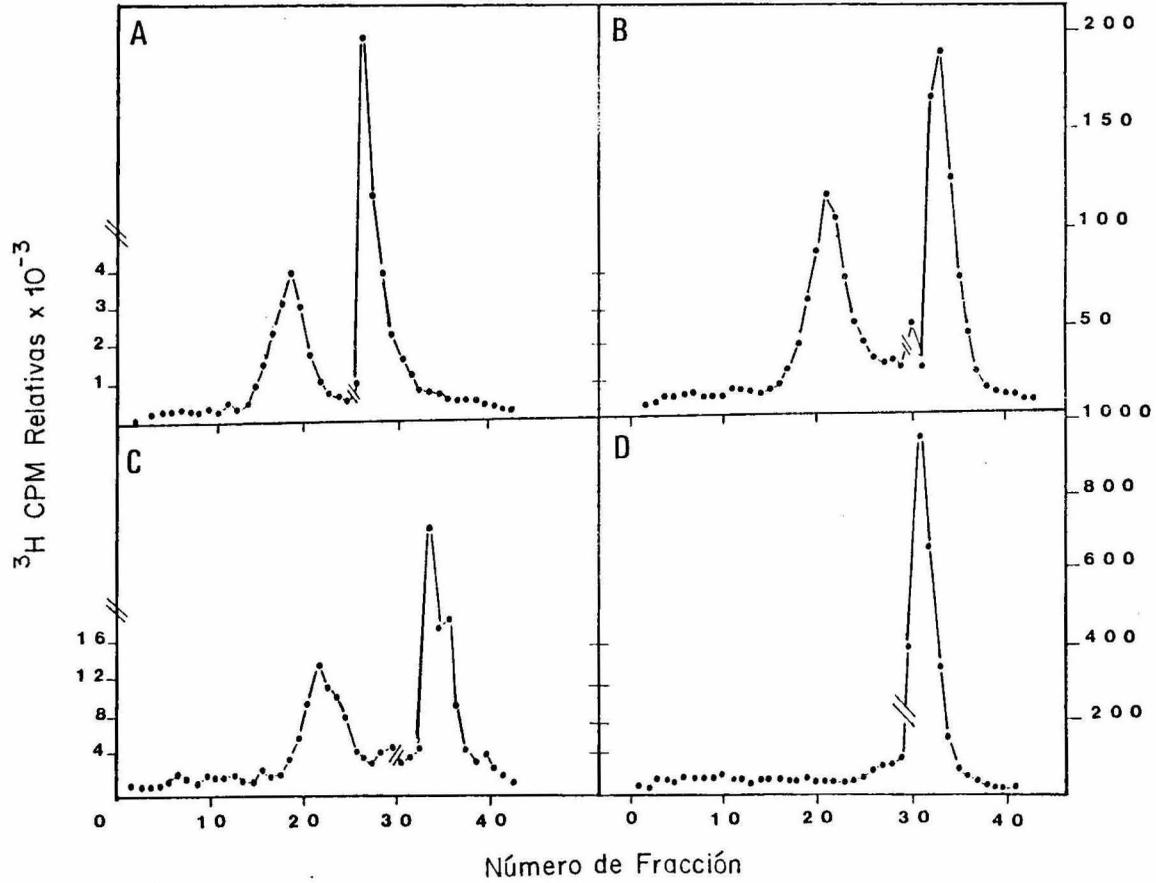
## 2) Determinación el número de copias de pYK007 por hibridación.

Para cuantificar de una forma mas directa el número de copias de pYK007 por equivalente genómico, se optó por emplear la hibridación de DNA purificado de pYK007 contra el DNA total a partir de lisados crudos de las cepas en estudio.

FIGURA 9. Análisis del perfil de DNA de las cepas silvestres,  $cya^{\Delta}$  y  $crp^{\Delta}$ , sin pYK007, en gradientes de CsCl-EtBr.

Se obtuvieron lisados crudos de las cepas marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina, y se sometieron a centrifugación en gradientes analíticos de CsCl-EtBr como se describe en la sección 11 de materiales y métodos, con la única diferencia de que en éste experimento, no se incluyó un control interno marcado con  $^{14}\text{C}$ . Los gradientes fueron perforados por la base, y la radiactividad de las fracciones determinada.

Perfil del gradiente A: CA8000; B: CA8306 ( $cya^{\Delta}$ ); C: CA8445 ( $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$ ); y D: J54.



Esta metodología presenta varias ventajas, entre ellas: 1) La hibridación, en condiciones de exceso de pYK007 puro, inmovilizado a filtros de nitrocelulosa, implica que todo el DNA del pYK007 presente en los lisados crudos de las cepas puede ser detectado, independientemente de la configuración molecular del plásmido, asumiendo que el tratamiento de desnaturalización es igualmente efectivo para generar DNA de cadena sencilla a partir de las diferentes formas del plásmido. 2) La hibridación realizada en condiciones estrictas, minimiza la hibridación inespecífica de secuencias no relacionadas con pYK007. Si se tienen los controles adecuados, se puede determinar cual es el fondo inespecífico de hibridación del plásmido críptico, y en consecuencia no interfiere con la cuantificación del pYK007.

Para realizar los experimentos de hibridación, fué importante definir las condiciones óptimas de la inmovilización de DNA a filtros de nitrocelulosa, la linealidad de la fijación de las concentraciones de trabajo de DNA a los filtros, y la eficiencia de hibridación, que se describen a continuación.

**1) Comprobación de la presencia de pYK007 como único plásmido en la cepa 7A-35.**

La purificación de pYK007, para emplearlo como sonda en la hibridación, requería, evidentemente, del uso de una cepa que contuviera exclusivamente dicho plásmido.

En estudios del ligamiento de Ap y ST realizados en este laboratorio (H. Stieglitz y R. Fonseca), se caracterizaron varias transconjugantes de la cepa clínica donadora 40-IEC-4, a la recipiente J54. Una de estas transconjugantes, la 7A-35 (ST+Apr), mostró repetidamente una sola banda de las características de pYK007 en geles de agarosa, por lo que podría considerarse como candidata. En adición, en la figura 9 se observa que en la cepa J54 no se detecta DNA superhelicoidal, lo que implica que se usó un fondo

genético libre de plásmido para la conjugación. La J54 pYK007 referida en todos los experimentos previos, no es comparable con la 7A-35, porque la primera, se obtuvo como transconjugante en una cruz de regreso de la CA8000 (pYK007) a la J54, y parece ser, que tanto el pYK007, como el plásmido criptico se transfirieron.

Para comprobar que la cepa 7A-35 tiene como huésped único a pYK007, se aisló DNA marcado con  $^{14}\text{C}$  de la cepa y se corrió en un gradiente preparativo de  $\text{CsCl-EtBr}$  (método 13). La región de plásmido fué purificada (figura 10A), y una alícuota de esta se corrió en gradientes analíticos de sacarosa de 5%-20% (método 12). El perfil de el gradiente de velocidad de sedimentación que se presenta en la figura 10B, revela la presencia de un solo pico de DNA de plásmido, sugiriendo, que la cepa 7A-35 contiene solamente un elemento extracromosómico; éste puede considerarse pYK007 por la migración exhibida en geles de agarosa y por su manifestación fenotípica, mencionadas en el párrafo anterior. En base a estos resultados, a partir de la cepa 7A-35 se purificó el DNA de pYK007 usado en los experimentos de hibridización.

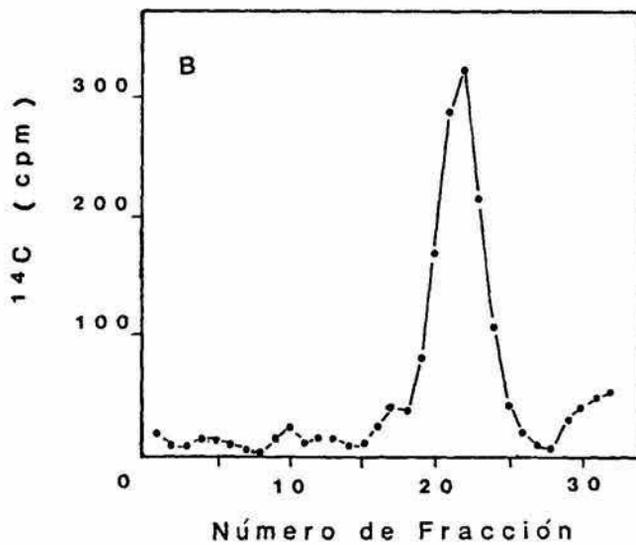
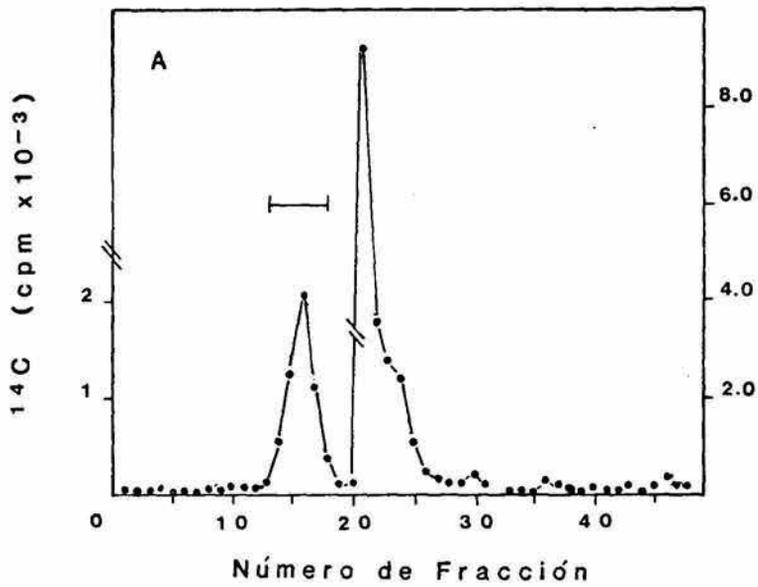
ii) Eficiencia y linealidad de la inmovilización de DNA a filtros de nitrocelulosa.

Para determinar la eficiencia de unión del DNA a filtros de nitrocelulosa, se marcaron con  $^3\text{H}$ -timina cultivos de la cepa CR34 ( $\text{thy}^-$ ) y se generaron lisados claros (ver método 12); el DNA cromosómico contenido en la pastilla, fué purificado por extracción fenólica de la pastilla, y extracción del fenol con éter. A esta preparación se le determinó la concentración de DNA por difenilamina (método 20) y las cuentas incorporadas (método 7), calculándose así la actividad específica. 10 muestras con 2.5  $\mu\text{g}$  de DNA, se desnaturalizaron, y se inmovilizaron en 10 filtros de nitrocelulosa (sección 17 de materiales y métodos). El DNA retenido en los filtros fué contado y comparado con las cuentas adicionadas

FIGURA 10. Análisis de el DNA superhelicoidal de la cepa 7A-35 en gradientes de velocidad de sedimentación.

A. Gradiente preparativo de CsCl-EtBr de lisados claros de la cepa 7A-35. Cultivos en fase exponencial de la cepa 7A-35 fueron marcados con  $^{14}\text{C}$ , y lisados como se indica en la sección 12 de materiales y métodos. Se elaboraron gradientes preparativos de CsCl-EtBr, se colectaron y se purificó el DNA de plásmido como se describe en los procedimientos 13, 14 y 15 de materiales y métodos. Se muestra el pico de DNA de plásmido que se purificó de estos gradientes.

B. Análisis del DNA de plásmido de la cepa 7A-35 en gradientes de velocidad de sedimentación. Alícuotas de las muestras obtenidas del gradiente previo, fueron aplicadas a gradientes de sacarosa de 5 % a 20 % (0.5 M NaCl) y se centrifugaron a 45,000 rpm, en el rotor SW 50.1, durante 45 min a 15°C. El fraccionamiento y la determinación de la radiactividad de las fracciones se describen en materiales y métodos.



inicialmente; en éstas condiciones, del 91% al 96% de las cuentas fueron retenidas, indicando que la unión del DNA a los filtros es eficiente.

La linealidad de la fijación de DNA (1-20  $\mu\text{g}$ ) a los filtros de nitrocelulosa fué determinada empleando DNA marcado como se indica en el experimento anterior. 40  $\mu\text{g}$  de DNA fueron desnaturalizados; de esta solución se tomaron volúmenes correspondientes a 1  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  y 20  $\mu\text{g}$  de DNA (por duplicado), se inmovilizaron en filtros de nitrocelulosa, y se determinó la radiactividad retenida. Con las cuentas resultantes se graficó la concentración del DNA inmovilizado en los filtros de nitrocelulosa contra la radiactividad retenida.

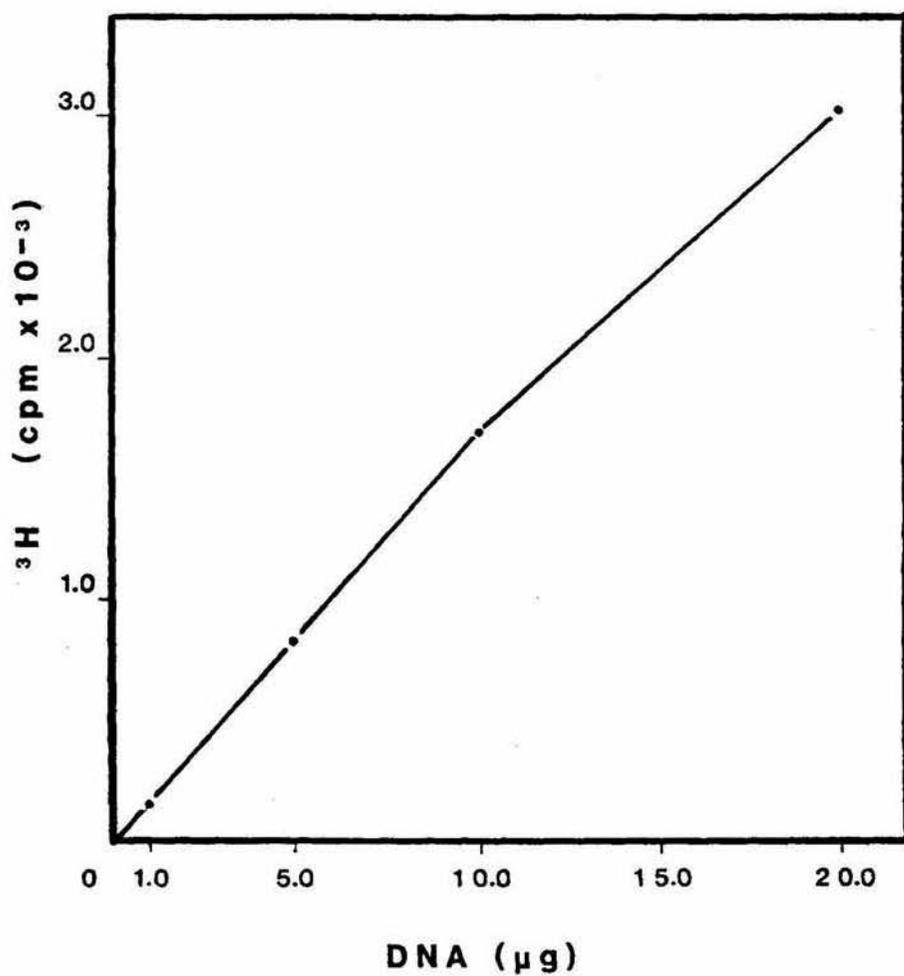
En la figura 11, se muestra la linealidad de la fijación de 1  $\mu\text{g}$  a 20  $\mu\text{g}$  de DNA a filtros de nitrocelulosa. Se observa que el DNA se pega linealmente hasta 10  $\mu\text{g}$ , y a concentraciones mayores de ésta se aprecia un ligero cambio de pendiente. La linealidad encontrada, es satisfactoria para los experimentos de hibridización, ya que en estos se definió inmovilizar un exceso de DNA de pYK007 de 50 veces (con respecto al DNA total de pYK007 en solución), lo cual equivale a 5  $\mu\text{g}$ . Este último valor se calculó asumiendo que los cultivos empleados en las hibridizaciones tienen una densidad de  $2.5 \times 10^8$  células; considerando que  $1 \times 10^8$  células contienen una concentración de DNA total igual a 1  $\mu\text{g}$  y que el porcentaje de plásmido con respecto al DNA total es del 1 % al 4 %, se obtiene que en  $2.5 \times 10^8$  células hay de 0.025  $\mu\text{g}$  (1 %) a 0.1  $\mu\text{g}$  (4 %) de plásmido, y un exceso de 50 veces de éstos, es 1.25  $\mu\text{g}$  y 5  $\mu\text{g}$  respectivamente.

### iii) Eficiencia de hibridización.

A cantidades fijas de DNA puro de pYK007, inmovilizado en filtros de nitrocelulosa (en un exceso igual o mayor a 50 veces), se añadieron concentraciones constantes de lisados crudos de la

FIGURA 11. Linearidad de la inmovilización de DNA a filtros de nitrocelulosa.

Se purificó DNA marcado con  $^3\text{H}$  y se calculó su actividad específica como se indica en el texto. De esta preparación se tomaron 40  $\mu\text{g}$ , se desnaturalizaron, se fijaron las cantidades indicadas a filtros de nitrocelulosa como se describe en la sección 17 de materiales y métodos, y se determinó la radiactividad de el DNA retenido en los filtros.



cepa J54 sin plásmido, mezclados con cantidades conocidas y crecientes de pYK007 marcado y purificado. Las cantidades elegidas para pYK007 en la solución de hibridización, equivalen a 10, 18 y 27 copias, lo cual es un exceso si se considera que plásmidos autotransferibles existen en relaciones de 1 a 3 copias por equivalente genómico. Es importante realizar la hibridización en presencia de lisados totales, porque son las condiciones en las que se trabajará para la determinación de número de copias.

El DNA puro de pYK007 para la fijación a filtros de nitrocelulosa, se obtuvo a partir de 5 lt de cultivo de la cepa 7A-35, por el método de nitrocelulosa. La cuantificación del DNA se efectuó fluorométricamente por una modificación del método de DABA (descrito en la sección 20 de materiales y métodos), ya que es más sensitivo que el método de difenilamina. El DNA obtenido de los 5 litros (110 µg), fué inmovilizado en filtros de nitrocelulosa (5 µg/ filtro) como se describe en materiales y métodos.

Los lisados crudos de la cepa J54 sin pYK007, fueron obtenidos por lisis con tritón, y el DNA cuantificado por difenilamina; se usó una cantidad equivalente a la que tendría 1 ml de un cultivo crecido a 100 U.K. ( $5 \times 10^8$  células/ml), si en  $1 \times 10^8$  células/ml hay 1 µg de DNA, i.e. 5 µg/ml.

El DNA marcado y purificado de pYK007, que se adicionó a los lisados crudos, fué aislado de la región superhelicoidal de un gradiente isopícnico de CsCl-EtBr de la cepa 7A-35; la región cromosómica también se colectó y se determinó la actividad específica de este DNA. Se asumió que la actividad específica del cromosoma es igual a la del plásmido.

La hibridización se realizó como sigue: se tomaron muestras del pYK007 marcado equivalentes a: 0.6 µg (10 copias), 1.2 µg (18 copias) y 1.8 µg (27 copias); a estas muestras, se agregó 0.5 ml de lisados crudos de J54 sin plásmidos, y se llevaron al mismo vo-

lúmen con 0.1 x SSC. Se incluyó otra muestra con 1.8 µg de pYK007 marcado, sin adicionar lisado. Se desnaturalizaron las muestras y se agregó la mezcla de hibridización a cada una; 2 ml de las diferentes mezcla se hibridización fueron adicionados a viales, conteniendo 2 filtros con 5 µg de pYK007 puro, y se incubaron por 5 días a 42°C.

Terminada la hibridización, los filtros fueron procesados, y contados, determinándose el porcentaje de la cuentas que hibridizaron con respecto a las cuentas totales añadidas (cuantificadas en alícuotas de las mezclas antes de la hibridización); los datos obtenidos se muestran en la figura 12.

En la figura 12A, que presenta cuentas hibridizadas a pYK007 v.s. concentración de pYK007 (en número de copias), se observa que la hibridización es aproximadamente lineal aún para concentraciones de pYK007 equivalentes a 27 copias, implicando que el sistema no está a saturación, y en la figura 12B, donde se muestra el porcentaje de cuentas hibridizadas a los filtros con respecto a las cuentas iniciales en la hibridización para los diferentes números de copias adicionadas, se aprecia que la eficiencia de hibridización fluctuó entre 60 % y 70 %.

iv) Hibridización de lisados crudos de las cepas silvestre, *cya*<sup>Δ</sup>, y *crp*<sup>Δ</sup>, con el pYK007, contra DNA de pYK007 inmovilizado en filtros de nitrocelulosa.

En base a los experimentos anteriores, en donde se encontró que el sistema es lineal para 10 µg de DNA fijado al filtro, así como para el DNA a hibridizar (considerando aún un exceso de número de copias), y que la eficiencia de hibridización es del 60% a 70%, se decidió que las condiciones de hibridización son apropiadas para continuar con la determinación del número de copias.

FIGURA 12. Eficiencia de la hibridización DNA-DNA.

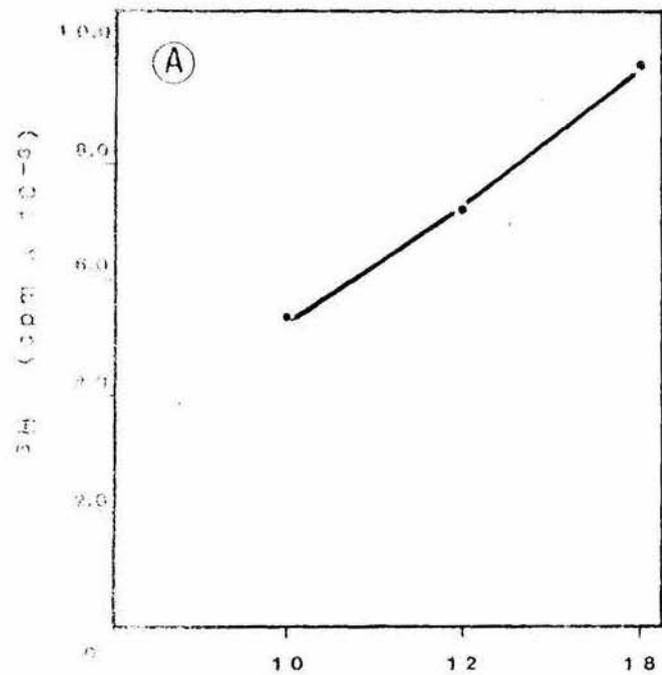
La metodología y explicación del experimento se encuentran descritos en el texto.

0.6  $\mu\text{g}$  es equivalente a 10 copias; 1.2  $\mu\text{g}$  a 18 copias; y 1.8  $\mu\text{g}$  a 27 copias.

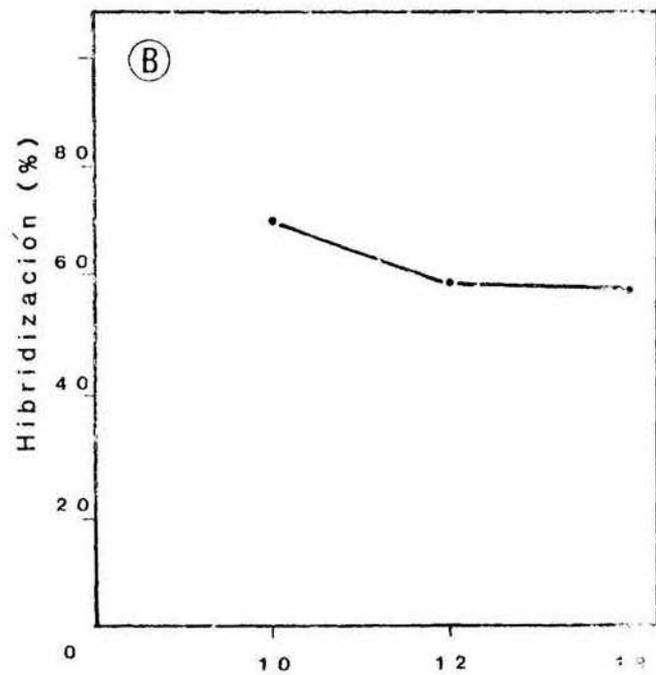
Para el cálculo del número de copias a que son equivalentes las cantidades de DNA empleadas, se utilizaron las siguientes relaciones:

- 1) El P.M. de pYK007 =  $77.6 \times 10^6$  dal = g/mol  
por lo tanto, 1  $\mu\text{g}$  de pYK007 = 0.0129 pmoles
- 2)  $(0.0129 \text{ pmoles}) (X \mu\text{g de pYK007}) (6.023 \times 10^{23} \text{ moléc./mol})$   
 $(1 \times 10^{-12} \text{ pmoles}) = \text{moléculas de pYK007 en } X \mu\text{g de pYK007}$   
en donde;  
 $6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol} = \text{no. de Avogadro.}$
- 3)  $\frac{\text{moléculas de pYK007 en } X \mu\text{g}}{\text{no. de células}} = \frac{\text{no. de copias de pYK007}}{\text{célula}}$

Considerando que en la hibridización se emplean cultivos con una densidad de  $5 \times 10^8$  células, y sustituyendo  $X \mu\text{g}$  por 0.6, 1.2 y 1.8  $\mu\text{g}$  de pYK007, se obtienen un equivalente a 10, 18 y 27 copias respectivamente.



No. de copias de pYK007



No. de copias de pYK007

Se prepararon filtros de nitrocelulosa con 5  $\mu\text{g}$ /filtro de pYK007, purificado a partir de 10 litros de cultivos de la cepa 7A-35 (10 lt por experimento). Cultivos de las cepas CA8000, CA8306, CA8445 y J54, sin pYK007 (las cepas CA poseen al plásmido críptico, y la cepa J54 está libre de plásmidos), fueron marcados con  $^3\text{H}$ -timidina, y se detuvo la incorporación a 100 U.K.; las células fueron lavadas, tratadas, y el DNA obtenido fué desnaturalizado. Se agregaron los componentes de la mezcla de hibridización y 2 ml de ésta fué añadida a viales conteniendo, 2 filtros con 5  $\mu\text{g}$  de pYK007 y 2 filtros blanco, sin DNA, por cada cepa. Con los volúmenes restantes de la mezcla de hibridización, se determinaron las cuentas adicionada en ésta a cada vial (100%). Transcurridos 5 días de hibridización a 42°C, los filtros fueron tratados y contados.

A las cuentas de los filtros con DNA para las diferentes cepas, se sustrajo las cuentas de los filtros blanco correspondientes, y con estos datos, se calculó el porcentaje de hibridización en relación a las cuentas totales adicionadas; usando los porcentajes resultantes se determinó el número de copias de pYK007 con los valores de  $77.6 \times 10^6$  dal para el peso molecular de pYK007, y 1 equivalente genómico ( $2.5 \times 10^9$  dal), al igual que los cálculos de los experimentos anteriores (ver inciso iv).

Los resultados de la tabla 5, en donde se encuentran los datos obtenidos del experimento descrito, muestran que la hibridización de fondo del cromosoma (representada por la cepa libre de plásmidos) es de 0.87%, que traducido a número de copias, es de 0.27 copias; y la hibridización de fondo del cromosoma mas el plasmido críptico (cepas CA), varía entre 1.11% a 0.9%, con números de copias de 0.35 a 0.28 respectivamente. De estos datos se deduce que el aumento de hibridización inespecífica promedio como consecuencia del plásmido críptico es del 0.16%, correspondiente a 0.05 copias, lo que sugiere, que dicho plásmido no presenta

TABLA 5. Comparación de la hibridización del DNA cromosómico y del plásmido críptico, contra el DNA de pYK007.

cepa	% de hibridización de DNA total a DNA de pYK007 <sup>a</sup>	Fondos reflejados en número de copias de pYK007 por equivalente genómico <sup>b</sup>
CA8000	1.4	0.35
CA8306	0.9	0.28
CA8445	1.1	0.35
J54	0.87	0.27

<sup>a</sup> Lisados crudos de la cepa J54 (libre de plásmidos) y de las cepas de la serie CA, que contienen al plásmido críptico, fueron hibridizados contra DNA de pYK007 como se describe en el texto. El porcentaje de hibridización se calculó comparando las cuentas hibridizadas a los filtros con el DNA de pYK007 menos los blancos, con las cuentas del DNA total añadido en la hibridización; se puede expresar como sigue:

$$\left( \frac{\text{cpm hibridizadas a pYK007} - \text{cpm blancos}}{\text{cpm totales añadidas a la hibridización}} \right) \times 100\% = \begin{array}{l} \text{\% de hibridi-} \\ \text{zación de DNA} \\ \text{total a pYK007} \end{array}$$

<sup>b</sup> El número de copias por equivalente genómico se calculó como se indica en el pie de la figura 4.

homología con el pYK007; entonces, la hibridización de pYK007 al plásmido críptico en nuestras condiciones, puede considerarse muy baja.

Definido lo anterior, en experimentos subsecuentes solo se usó J54 como blanco, ya que el bajo rendimiento en el aislamiento de pYK007 para ser fijado en los filtros, resultó un factor limitante en el número de muestras a hibridizar.

Para la determinación de número de copias, se repitió el experimento anterior, como se describe en la sección de materiales y métodos. En éste, se emplearon las cepas CA8000 (pYK007), CA8306 (pYK007,  $cya^{\Delta}$ ), CA8445 (pYK007,  $cya^{\Delta}$   $crp^{\Delta}$ ), J54 (pYK008) y J54 .

Los datos obtenidos en dos experimentos independientes, fueron promediados, y los valores encontrados se presentan en la tabla 6, en donde se observa que la diferencia máxima en número de copias de pYK007 por equivalente genómico con respecto a la cepas  $cya^{\Delta}$  y  $cya^{\Delta}$   $crp^{\Delta}$  es de 0.44 copias; en otras palabras, la reducción de número de copias de pYK007 en las cepas deficientes en represión catabólica, con respecto a la cepa silvestre, es menor a una copia. También se determinó que el número de copias de pYK008 por equivalente genómico en la cepa J54, es de uno.

En los datos de número de copias determinados en gradientes de CsCl-EtBr, al igual que los datos anteriores, no se encontraron diferencias significativas, tales que expliquen, los niveles de toxina en la cepa  $cya^{\Delta}$  en ausencia de AMPc y la  $cya^{\Delta}$   $crp^{\Delta}$ , en ausencia o presencia del mismo, que son 100 veces menores a los observados en la cepa silvestre.

Considerando que se encontró una diferencia máxima de una copia de pYK007 por equivalente genómico, comparada con un efecto de AMPc de 100 veces, los resultados anteriores excluyen la posibilidad de que el efecto de AMPc sobre la actividad de la enterotoxina

TABLA 6. Efecto de las deleciones en  $cya^{\Delta}$  y  $crp^{\Delta}$  sobre el número de copias de pYK007 determinado por hibridización.

Cepa	% de hibridización de DNA total a DNA de pYK007 <sup>a</sup>	Número de copias de pYK007 por equivalente genómico <sup>b</sup>
CA8000 (pYK007)	7.08	2.27
CA8306 (pYK007)	6.64	2.14
CA8445 (pYK007)	5.70	1.83
J54	0.00	0.00
J54 (pYK008)	3.24	1.00 <sup>c</sup>

Lisados crudos de las cepas marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina fueron hibridizados contra el DNA de pYK007 inmovilizado en filtros de nitrocelulosa como se describe en el texto. Los datos presentados, son el promedio de dos experimentos independientes.

<sup>a</sup> Los porcentajes de hibridización fueron calculados, tomando las cuentas hibridizadas contra pYK007, sustrayendo las de la cepa J54 (cromosoma), y comparandolas con las cuentas del DNA total que participó en la hibridización, con la siguiente relación:

$$\left( \frac{(\text{cpm hibridizadas, cepa X}) - (\text{cpm hibridizadas, cepa J54} - \text{cpm hib. a blancos})}{\text{cpm totales añadidas a la hibridización}} \right) \times 100\% = \text{\% de hibridización de DNA total a pYK007}$$

en donde;

cepa X = cepas listadas en la tabla, hibridizadas contra pYK007.

<sup>b</sup> El número de copias por equivalente genómico, se determinó como se indica en el pie de la figura 4, tomando el % de hibridización de DNA total a pYK007 como el % de plásmido.

<sup>c</sup> Resultado de un experimento.

en las cepas  $cya^{\Delta}$  y  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$ , se deba a una reducción del número de copias de pYK007 en estas cepas, y sugieren que la regulación de la actividad de ST, por represión catabólica no se encuentra a nivel de replicación del DNA del plásmido que codifica para la enterotoxina ST.

## II. EFECTO DE LAS MUTACIONES $cya^{\Delta}$ Y $crp^{\Delta}$ SOBRE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LA TOXINA ST.

Una vez que se ha establecido, que el efecto de AMPc no se manifiesta como respuesta a cambios en el número de copias del plásmido pYK007, en las cepas deficientes en represión catabólica, cabe la posibilidad, de que la regulación de la toxina por el complejo AMPc-proteína receptora del AMPc, se lleve a cabo a nivel de secreción, provocando la acumulación intracelular de la exotoxina.

En esta parte del trabajo, se describirán experimentos realizados con el objetivo de eliminar la posibilidad de que la ausencia del complejo AMPc-proteína receptora del AMPc, en las cepas deficientes en represión catabólica, provoque una acumulación intracelular de toxina activa, que pueda explicar la ausencia de ésta en los sobrenadantes.

Para demostrar que no existe una acumulación de toxina intracelular activa en las cepas  $cya^{\Delta}$  y  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$ , el enfoque experimental, fué el rompimiento y liberación del contenido intracelular de las cepas en cuestión, y ensayar para actividad de ST.

El método de rompimiento elegido fué el de ultrasonificación, el cual, ha sido ampliamente usado porque es un método rápido y efectivo para el rompimiento de microorganismos o tejidos. Una desventaja de el uso de esta técnica, es que genera grandes cantidades de calor, lo que puede alterar la actividad o estructura de proteínas.

### 1) Cuantificación de la ruptura celular por sonicación.

Con el objeto de determinar las condiciones y tiempos de sonicación en los que se obtiene un porcentaje alto de rompimiento celular, se realizó el siguiente experimento: un cultivo de la cepa J54 pYK007, fué desarrollado en medio T durante 18 hr, a 37°C con agitación vigorosa. Las células fueron cosechadas y lavadas dos veces con PBS, resuspendiéndose en un volúmen final de 10 ml de PBS; 2 ml se usaron para determinar el porcentaje de proteína total en las células, por el método de Biuret (48), y los 8 ml restantes, fueron transferidos a un vial de vidrio, y mantenidos a 4°C, en baño de hielo. La muestra se sonicó como se describe en materiales y métodos, por pulsos de 15 seg e intervalos de 30 seg de descanso, por un tiempo efectivo de sonicación de 5 min, tomando alícuotas de 2 ml a 1, 2 y 5 min; éstas, fueron centrifugadas, y con el sobrenadante (proteína soluble liberada), se determinó la concentración de proteína liberada durante la sonicación y se calculó el porcenje de ésta, con respecto a la concentración total de proteína en células intactas.

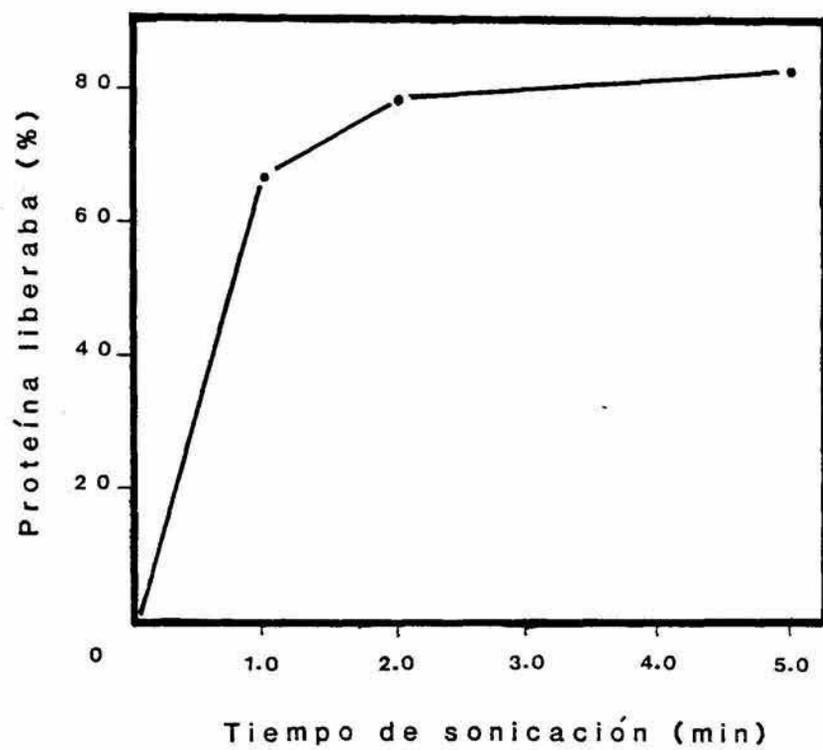
En la figura 13, realizada con los datos generados del experimento antes descrito, se muestra el porcentaje de liberación de proteína en relación al tiempo de sonicación; se observa que la eficiencia de sonicación aumenta en un 10% del primer min, al segundo, en donde se liberó un 79% de la proteína, y del minuto 2 al 5, sólo aumenta un del 5% al 6%, obteniéndose una eficiencia del 85%. En un segundo experimento, se obtuvieron eficiencias del 85% al 95% para tiempos de 1 a 5 min.

Con una eficiencia de sonicación del 80% de 2 a 5 min, se esperaría que la mayoría de la toxina intracelular soluble (si existe) se libere, por lo cual, estas condiciones resultan adecuadas, sin embargo, no se puede afirmar que la sonicación por estos tiempos e intensidad, no afecte a la enterotoxina, de manera que se inactive, o dismiuya su actividad.

**FIGURA 13. Eficiencia de la ruptura celular por sonicación**

Cultivos de 50 ml de la cepa J54 pYK007 en medio T fueron incubados a 37°C y crecidos durante 18 horas. Las células se concentraron a 10 ml de PBS, de donde se tomaron 2 ml antes de sonicar y el resto se sonicó por 5 min, como se describe en el texto. Durante la sonicación se extrajeron alícuotas a los tiempos indicados, se centrifugaron, y se recuperaron los sobrenadantes con la proteína solubilizada por sonicación.

Empleando el método de Biuret, se determinó la concentración de proteína en las células intactas (100 %), y en los sobrenadantes a los diferentes tiempos de sonicación.



## 2) Efecto de la sonicación sobre la actividad de ST.

Con la finalidad de definir si la sonicación afecta la actividad de ST, se llevó a cabo el siguiente experimento: cultivos de la cepa J54 (pYK007), fueron crecidos en medio T, a 37°C con agitación, durante la noche. Los cultivos se centrifugaron, y se recuperó el sobrenadante con la toxina extracelular; parte del sobrenadante se sonicó por 5 minutos, tomando alícuotas cada minuto, ó a 1, 2 y 5 minutos. Las muestras sonicadas y sin sonicar, se diluyeron seriadamente, y se determinó la actividad de ST con el ensayo del ratón lactante como se indica en la sección 19 de materiales y métodos. En la tabla 7 se muestran los resultados de los títulos de 3 experimentos; se observa, que en ocasiones hay diferencias de una dilución en el título de la toxina, sin embargo, el hecho de que estas variaciones parecen darse al azar, a tiempos largos o cortos de sonicación, y no presentan una tendencia que indique que a tiempos largos baja la actividad de ST, sugiere que la sonicación no afecta la actividad de la toxina. Las diferencias observadas podrían ser el resultado de la fluctuación del ensayo biológico, por un lado, y por otro, de la manipulación del mismo; la respuesta de los ratones varía significativamente con 1 o 2 días de diferencia de edad, por lo que es necesario, o distribuir adecuadamente una población heterogénea, ó trabajar con una homogénea.

## 3) Determinación de la actividad intracelular de ST en sonificados de las cepas en estudio.

Definidas las condiciones de sonicación y la estabilidad de la actividad de ST en esas condiciones, se efectuaron experimentos para determinar si las cepas  $cya^{\Delta}$  y  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$  en ausencia de AMPc, acumulan toxina intracelular activa.

**TABLA 7.** Efecto de la sonicación sobre la actividad de la enterotoxina ST extracelular.

Experimento	Actividad de ST <sup>a</sup> en sobrenadantes					
	Sin sonicar	Tiempos de sonicación				
		1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
1	16	16	8	16	16	16
2	32	16	32	32	32	16
3	n.d.	32	n.d.	n.d.	n.d.	32

Sobrenadantes de cultivos de la cepa J54 pYK007 crecida en medio T a 37°C durante 18 hrs, fueron sonicados como se describe en el texto, por los tiempos indicados. Las muestras sonicadas y los controles sin sonicar, fueron diluidos seriadamente, y las diluciones ensayadas para actividad de ST en la prueba de ratón lactante, como se describe en materiales y métodos (sección 19).

<sup>a</sup> Los valores de actividad de ST que se muestran, corresponden a la recíproca de la dilución máxima en la que se detectó una respuesta positiva en los ratones. El valor de corte fué  $\geq 0.080$ .

Cultivos desarrollados durante la noche de las cepas silvestres [CA8000, J54, y CA8000 (pYK007)], de las cepas deficientes en adenil ciclasa [CA8306 (pYK007)], de las cepas deficientes en adenil ciclasa y CRP [CA8445, y CA8445 (pYK007)], y de la cepa J54 (pYK008), fueron diluidos 1:100 en 100 ml de medio T y crecidos durante 18 hr, a 37°C, después de las cuales, se cosecharon los cultivos y se obtuvieron los sobrenadantes y las pastillas; estas últimas fueron lavadas con PBS y resuspendidas en un volumen final de 20 ml de PBS. Los cultivos se sonicaron como se describió previamente, a 4°C, por 3 min. Las muestras sonicadas se dividieron en dos: en una alícuota se determinó la eficiencia de sonicación como se hizo en 1, con la diferencia de que la proteína se determinó por el método de Lowry (75); con las alícuotas restantes, y los sobrenadantes de medio T, se hicieron diluciones seriadas y se probaron para actividad de ST, en el ensayo del ratón lactante.

Los resultados obtenidos de la actividad de ST en sonicados de las cepas deficientes en el complejo AMPC-CRP, se presentan en la tabla 8, en donde se muestra que no se detectó actividad de ST en los sobrenadantes, ni en los extractos sonicados de las cepas sin el plasmido, y de las cepas CA8306 (pYK007 cya<sup>Δ</sup>), CA8445 (pYK007 cya<sup>Δ</sup> crp<sup>Δ</sup>) y J54 (pYK008). En los sobrenadantes de las cepas CA8000 (pYK007) y J54 (pYK007), se encontró 160 veces más actividad toxigénica, comparada con las pastillas sonicadas de las mismas cepas, en las cuales se aprecian niveles muy bajos. Estos resultados indican que las cepas deficientes en represión catabólica no acumulan enterotoxina intracelular activa.

#### 4) Efecto del calentamiento sobre la actividad intracelular de ST en las cepas silvestres, cya<sup>Δ</sup> y crp<sup>Δ</sup>.

Si bien, en la tabla 8 se observa que extractos sonicados de las cepas CA8000 (pYK007) y J54 (pYK007) presentan niveles de toxina muy bajos, en algunos experimentos se encontró mayor actividad toxigénica en estos sonicados. A pesar de que todos los expe-

TABLA 8. Actividad de la enterotoxina ST intracelular y extracelular en las cepas silvestre y las mutantes *cya*<sup>Δ</sup> y *crp*<sup>Δ</sup>.

Cepa	Actividad de ST <sup>a</sup>	
	Sobrenadantes	Células sonicadas <sup>b</sup>
CA8000	< 1	< 0.2
CA8445	< 1	< 0.2
CA8000(pYK007)	32	0.2
CA8306(pYK007)	< 1	< 0.2
CA8445(pYK007)	< 1	< 0.2
J54(pYK007)	32	0.2
J54(pYK008)	< 1	< 0.2

100 ml de cultivos en medio T de las cepas fueron incubados a 37°C durante 18 hr; los cultivos se centrifugaron y el sobrenadante se ensayó para actividad de ST. Las pastillas fueron lavadas dos veces con PBS, resuspendidas en 20 ml del mismo amortiguador y sonicadas a 4°C como se describe en el texto. Los extractos sonicados se dividieron en dos alicuotas: con una se determinó el porcentaje de solubilización de proteína por sonicación, descrito en la figura 13, y con el resto se ensayó actividad de ST como se describe en la sección 19 de materiales y métodos.

<sup>a</sup> La actividad de ST se muestra como la recíproca de la dilución máxima que presentó una respuesta positiva ( $\geq 0.0800$ ) en el ensayo de ratón lactante.

<sup>b</sup> Para las células sonicadas, los valores de la tabla están corregidos tomando en cuenta el factor de concentración inicial.

rimentos se realizaron en un baño de hielo, se hipotetizó que la variabilidad de la actividad de ST podría darse como respuesta a un incremento en la temperatura de parte de la suspensión, durante la sonicación. Para probar esta posibilidad, se examinó el efecto de calentamiento sobre los extractos sonicados: básicamente, se repitió el experimento anterior, obteniéndose extractos sonicados y sobrenadantes de cepas con los diferentes fondos genéticos estudiados; los sonicados fueron divididos, y una parte se ellos se mantuvo a 4°C, mientras que la otra mitad, se incubó a 65°C durante 30 min.

La actividad de ST determinada en las muestras del experimento descrito, se presentan en la tabla 9; se observa que extractos sonicados de las cepas CA8000 (pYK007) y J54 (pYK007), cuando son incubados a 65°C por 30 min, exhiben un aumento de 64 veces en los niveles de actividad toxigénica con respecto a los sonicados no calentados. En contraste, tanto en las cepas deficientes en represión catabólica, como en la cepa J54 (pYK008), no se detectó ST en sonicados calentados o no calentados, los cuales muestran un valor de actividad de toxina igual a la de los controles negativos (CA 800 y CA8445 sin pYK007). Estos resultados sugieren que en las cepas *cya+* *crp+* (CA8000 y J54) con el pYK007, existe toxina ST intracelular inactiva, la cual es termoactivable. Asimismo, las cepas deficientes en el complejo AMPc- proteína receptora de AMPc no mostraron el efecto de termoactivación, lo que indica que estas cepas no acumulan toxina intracelular inactiva sensible a activación por calor.

Los datos previos que muestran que las cepas *cya*<sup>Δ</sup> y *cya*<sup>Δ</sup> *crp*<sup>Δ</sup> con el pYK007 no acumulan toxina intracelular activa (tabla 8), y que tampoco acumulan toxina intracelular termoactivable (tabla 9), señalan, que el efecto de AMPc sobre la actividad de ST en estas cepas, no se debe a una alteración en la secreción de la toxina intracelular activa, o termoactivable.

TABLA 9. Efecto del calentamiento de extractos sonicados sobre la actividad de ST.

Cepa	Actividad de ST <sup>a</sup>		
	Sobrenadantes (extracelular)	Células <sup>b</sup> (intracelular)	
		Sonicados	Sonicados calentados
CA8000	< 1	< 0.2	< 0.2
CA8445	< 1	< 0.2	< 0.2
CA8000(pYK007)	32	0.2	12.8
CA8306(pYK007)	< 1	< 0.2	< 0.2
CA8445(pYK007)	< 1	< 0.2	< 0.2
J54(pYK007)	32	0.2	12.8
J54(pYK008)	< 1	< 0.2	< 0.2

100 ml de cultivos en medio T de las cepas fueron incubados a 37°C durante 18 hr; los cultivos se centrifugaron y el sobrenadante se ensayó para actividad de ST. Las pastillas fueron lavadas dos veces con PBS, resuspendidas en 20 ml del mismo amortiguador y sonicadas a 4°C como se describe en la sección 19 de materiales y métodos. Los extractos sonicados se dividieron en dos alícuotas: una fue mantenida a 4°C, la restante fue incubada a 65°C por 30 min, y ambas fueron ensayadas para actividad de ST.

<sup>a</sup> La actividad de ST se muestra como la recíproca de la dilución máxima que presentó una respuesta positiva ( $\geq 0.0800$ ) en el ensayo de ratón lactante.

<sup>b</sup> Para las células sonicadas, los valores de la tabla están corregidos tomando en cuenta el factor de concentración inicial.

## DISCUSION

Estudios preliminares en este laboratorio, mostraron un efecto del complejo AMPc-proteína receptora del AMPc sobre la actividad de la enterotoxina ST, basado en el hecho de que la cepa  $cya^{\Delta}$  en ausencia de AMPc y la cepa  $cya^{\Delta} crp^{\Delta}$  en ausencia o presencia de el mismo, presentan niveles de ST 100 veces mas bajos con respecto a los niveles observados en la cepa  $cya^{\Delta}$  en presencia de AMPc y en la cepa silvestre (80). Si bien, los hallazgos anteriores sugirieron que la enterotoxina ST podría encontrarse reprimida catabólicamente a nivel de la transcripción del gene ST, existen otros mecanismos congruentes con el efecto del AMPc, que no implican que el fenómeno se lleve a cabo sobre el gene ST.

En este trabajo se analizó la posibilidad de que los bajos niveles de toxina observados en condiciones en donde no existe un complejo funcional AMPc-CRP, pudiera darse por represión catabólica ejercida a nivel de la replicación del plásmido que codifica para ST, a nivel de la secreción de la toxina.

- i) Efecto de las deleciones en  $cya$  y  $crp$  sobre el número de copias del pYK007 por equivalente genómico.

Varios investigadores (92,127,141) han reportado que el aumento en la síntesis de productos codificados en plásmidos, ha sido consecuencia de un aumento correspondiente en el número de copias del plásmido, resultando en un efecto de dosage génico (ie., la síntesis de el producto para el que codifica un gene está correlacionada linealmente con el número de copias del gene). En el caso de la bacteriocina marcescina A, se describió un efecto de dosage génico en mutantes que presentaron un aumento de dos a tres veces en el contenido del plásmido responsable de la síntesis de la bacteriocina (127). Nordsström y col. (92), reportaron que el incremento de dos a cuatro veces en la resistencia a antibioticos mediada por el plásmido mutante R1drd-19, se debió a un efecto de

dosaje génico por el aumento de dos a cuatro veces en el número de copias del plásmido. También se ha descrito un efecto de represión catabólica sobre la replicación de plásmidos: Katz y col. (62), encontraron un aumento de dos veces en la velocidad de síntesis del plásmido ColE1 al adicionar AMPc a cultivos crecidos en medio con glucosa; en cultivos crecidos en medio con glicerol, observaron un aumento de 1.5 a 1.9 veces en la cantidad total de ColE1 y ColE2, con respecto a cultivos crecidos en presencia de glucosa.

En los experimentos descritos, se obtuvieron efectos de dosaje génico de máximo cuatro veces por el aumento del número de copias de los plásmidos estudiados, e incrementos de dos veces en la replicación del plásmido por efecto del AMPc; en contraste, en ausencia del complejo AMPc-proteína receptora del AMPc, la actividad de ST está abatida 100 veces. A pesar de este hecho, se podría hipotetizar que el complejo AMPc-CRP pudiese regular la replicación del pYK007, de tal manera que provoque un cambio de 100 veces en el número de copias del plásmido por célula, resultando en un efecto de dosaje génico.

Es posible especular que un candidato para el blanco del complejo AMPc-CRP que provocara un efecto como el propuesto, podría ser una derepresión de la inhibición de la replicación del pYK007; se esperaría que pYK007 tuviese un mecanismo de inhibición, ya que todos los plásmidos en donde se ha estudiado la regulación del número de copias, controlan la replicación a nivel de iniciación, por mecanismos de control negativo (que resultan en la inhibición de la replicación del plásmido) (91). Cuando se altera importantemente algún mecanismo de inhibición, la sobreproducción de número de copias puede ser considerable, por ejemplo: Muesing y colaboradores (88), describieron un aumento de 20 a 30 veces en el número de copias del plásmido ColE1 como resultado de la ausencia de una molécula de RNA mensajero que actúa como represor de la replicación del plásmido.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de copias de pYK007 por equivalente genómico, excluyen la posibilidad de que las diferencias en los niveles de ST en las cepas silvestre y las mutantes en represión catabólica, pudieran darse como consecuencia de un efecto de dosaje génico mediado por el complejo AMPc-CRP, debido a que las diferencias en número de copias de pYK007 por equivalente genómico en la cepa CA8445 (pYK007) con respecto a la cepa CA8000 (pYK007) son de 0.44 a 0.7 copias, observándose una reducción de 1.7 veces (tabla 4) o un aumento de 1.24 veces (tabla 6), en el contenido de pYK007 en la cepa CA8000, con respecto de la CA8445. En cualquier caso (reducción o aumento), la diferencia máxima de número de copias entre las cepas silvestre y las deletadas en *cya* y en *crp*, no excedió a dos veces, y fué menor de una copia, en condiciones en las que las diferencias en los niveles de toxina son de 100 veces.

En base a los resultados anteriores, se puede predecir, que la adición de AMPc a la cepa *cya*<sup>Δ</sup> no provocaría un cambio mayor a una copia de pYK007; para comprobar esta suposición, se determinó el porcentaje de DNA superhelicoidal de la cepa CA8306 (pYK007) en presencia y ausencia de AMPc, y se obtuvieron números de copias de 1.2 y 1.0 respectivamente (datos no presentados). Estos resultados apoyan el hecho de que la represión catabólica de la actividad de ST, no se observa como consecuencia de un cambio en el número de copias de pYK007 por equivalente genómico.

Se usaron dos criterios para determinar el número de copias de pYK007 en las cepas en estudio: el primero fué, la determinación de la relación de plásmido superhelicoidal con respecto del DNA total empleando gradientes de CsCl-EtBr, y en el segundo, se cuantificó el porcentaje de hibridización de DNA total marcado radiactivamente, a DNA de pYK007 purificado. Los datos obtenidos con estos dos métodos muestran diferencias significativas: mientras el número de copias de pYK007 en la cepa CA8445 (pYK007) básicamente es el mismo en las dos determinaciones, los valores en-

contrados para las cepas CA8000 (pYK007) y CA8306 (pYK007) por hibridización, son respectivamente 1.27 y 1.14 copias mas altos, en relación a los obtenidos en la cuantificación por gradientes de CsCl-EtBr (tablas 6 y 4).

Estas discrepancias se podrían deber al hecho de que, en las condiciones de crecimiento usadas, cerca del 50% de las moléculas del plásmido pYK007 pueden estar presentes como complejo de relajación (56), lo cual resultaría en una subestimación del número de copias en la cuantificación con gradientes de CsCl-EtBr, ya que durante este procedimiento se induce la relajación de los complejos mencionados y solamente se detectan las moléculas superhelicoidales. Aunque no se hicieron experimentos de cuantificación, se mostró que el plasmido pYK007, efectivamente presenta complejos de relajación (figura 8).

Previamente se mencionó que el número de copias en la cepa CA8445 (pYK 007) es muy similar, juzgado por los dos métodos; lo anterior sugiere, que existe un porcentaje bajo de complejo de relajación en esta cepa. Estos datos estan en acuerdo con las observaciones de Katz y col. (62), quienes encontraron una disminución de el complejo de relajación de ColEI en cepas deficientes en represión catabólica. Considerando estas observaciones, se esperaría que la cepa CA8306 (pYK007) tuviera un porcentaje bajo de complejo de relajación (ya que los experimentos se hicieron en ausencia de AMPc), sin embargo el comportamiento de esta cepa difirió con el de la cepa CA8445 (pYK007), ya que el número de copias determinado por gradientes de CsCl-EtBr fué igual al de la cepa silvestre (tabla 4), y existe una diferencia de 1.14 veces con respecto al número de copias por hibridización (tabla 6); es posible que esto se deba a que los cultivos se crecieron en medio L, el cual podría contribuir con cantidades suficientes de AMPc para revertir parcialmente el efecto de represión catabólica sobre el complejo de relajación.

Además del porcentaje de complejo de relajación, otro factor que podría contribuir con las diferencias que se aprecian en la cuantificación del número de copias es la presencia del plásmido críptico (figura 9). Con respecto a éste, se hicieron algunas observaciones : cuando se sometió a electroforesis en gel de agarosa el DNA de las cepas del juego isogénico silvestre,  $cya^{\Delta}$ ,  $crp^{\Delta}$  con los plásmidos pYK007 y críptico, no se detectó este último, observándose únicamente una banda correspondiente al pYK007 (figura 2); asimismo, no se visualizó una banda de plásmido en los gradientes analíticos de CsCl-EtBr al irradiar con luz U.V. el DNA separado en los gradientes de las cepas CA8000, CA8306 y CA8445 con el plásmido críptico, y, finalmente, el plásmido extra observado en gradientes de velocidad de sedimentación, tuvo un desplazamiento mas lento, comparado con la especie que se asumió correspondía al pYK007. Estas observaciones sugieren que se trata de un plásmido con un número de copias muy bajo, y que tiene un peso molecular menor al de pYK007.

Considerando que las cepas del juego CA son HfrH, y que en una población bacteriana Hfr, la frecuencia de reversión a un estado  $F^+$  es muy baja, las observaciones sobre el plásmido críptico, podrían señalar que éste fuese el plásmido F, lo cual sería congruente con encontrar un número de copias bajo, y un peso molecular menor al de pYK007 [el P.M. de F es de  $63 \times 10^6$  dal (59)]; sin embargo, es contradictorio que la frecuencia de reversión de Hfr a  $F^+$ , que es de  $10^{-5}$  (1), es demasiado baja para explicar los niveles de detección del plásmido críptico en los gradientes de velocidad de sedimentación (figura 8).

Con los datos anteriores, no se puede concluir si el plásmido críptico es F; lo que parece claro, es que se encuentra en un número de copias mas bajo que pYK007, por lo cual es probable que su contribución en la cuantificación de número de copias por gradientes de CsCl-EtBr, sea muy pequeña. En relación a la determinación de número de copias por hibridización, en éstos experimentos se

demonstró que el porcentaje de hibridización cruzada entre el pYK 007 y el plásmido críptico es mínima (tabla 5), lo que indica, que hay muy poca homología entre estos dos plásmidos, y que el plásmido críptico no afecta la cuantificación de pYK007 por este método.

La cuantificación del porcentaje de un plásmido por el método de gradientes de CsCl-EtBr, estará sujeta a una subestimación siempre que el plásmido en cuestión contenga complejos de relajación, lo cual es una característica descrita para varios plásmidos (56), por tanto, puede considerársele como un método de cuantificación pobre, especialmente cuando el fenómeno en estudio implica diferencias pequeñas de número de copias. Varios investigadores han empleado este método (25,28,127); Cress y Kline (28), obtuvieron una disminución de dos veces en el número de copias del plásmido pcn-24 (derivado de f'lacI, P) con éste método, comparado con cuantificaciones por hibridización.

Los datos de números de copias de pYK007 obtenidos por el método de hibridización, son más precisos que los calculados a partir de gradientes de CsCl-EtBr, debido a que, la conformación del plásmido no influye en la eficiencia de detección, bajo las condiciones de desnaturalización empleadas, y porque se estableció que la presencia del plásmido críptico no interfirió con la cuantificación (tabla 5).

La eficiencia de hibridización en los experimentos de cuantificación fué de 60% a 70% (figura 12); ésto podría atribuirse a varios factores: a que parte del DNA del plásmido en solución se reasocia durante la hibridización, y/o otra fracción del plásmido hibridiza inespecíficamente con el DNA cromosómico (o específicamente si el plásmido pYK007 tiene secuencias IS), o también, a que se requieren tiempos de hibridización más largos. Se podría obtener una eficiencia más alta, inmovilizando el DNA total en los filtros y empleando una sonda de cadena única en la solución de hibridización, lo que evitaría la reasociación, y en parte, la

interferencia del cromosoma. En relación al uso de pYK007 como sonda, en la hibridización, cabe mencionar, que los datos obtenidos reflejan el número de copias de pYK007, pero no indican la presencia del gene ST en dicho plásmido, ya que el gene ST representa el 0.1% del DNA de pYK007. Aplicando una metodología de hibridización diferente a la empleada en este trabajo, sería posible cuantificar el número de copias de pYK007, utilizando una sonda específica contra el gene ST, lo cual permitiría asegurar la presencia de este gene; ésto tendría relevancia en el caso de las cepas que fenotípicamente son ST<sup>-</sup> [CA8445 (pYK007) y J54(pYK008)].

En los dos métodos de cuantificación se emplearon dos constantes: el peso molecular de pYK007 y el valor de un cromosoma de E. coli como equivalente genómico. Al término de este trabajo, Stieglitz y col. (121) reportaron un P.M. de 81.48 Md para pYK007 y 78 Md para pYK008, mientras que aquí, se obtuvo un valor de 77.6 Md para ambos plásmidos (figura 5).

En la determinación realizada por Stieglitz y col., se cortó el DNA de pYK007 con la enzima de restricción EcoR1, y los fragmentos resultantes se sometieron a electroforesis en geles de agarosa, incluyendo controles de P.M. convenientes; se calculó el P.M. de los fragmentos EcoR1, y de la sumatoria de éstos, se obtuvo el P.M. de pYK007. Este enfoque es más preciso que el descrito en las figuras 4 y 5, debido a que el empleo de fragmento de P.M. menores al de pYK007, se disminuye el error de la medición de la migración relativa, además de que en los geles de las figuras 2 y 3, no se incluyeron controles internos. Si se considera el P.M. de pYK007 igual a 81.48 Md y se recalculan los números de copias por equivalente genómico, se obtiene una diferencia promedio correspondiente a -0.0426 copias, por lo tanto, el P.M. de pYK007 determinado en este trabajo, y empleado en el cálculo de número de copias, no afecta significativamente los valores encontrados.

Se asumió que el equivalente genómico de E. coli en las condiciones de crecimiento empleadas, es de un cromosoma, con un valor de  $2.5 \times 10^9$  dal. Algunos investigadores (25,28,43,92,129) que han reportado determinaciones de números de copias de plásmidos de E.coli, también han asumido un cromosoma en reposo, es decir, en estado no replicativo ( $2.5 \times 10^9$  dal) como el equivalente genómico; en contraste, Tomizawa e Itoh (129a,117) tomaron el tamaño promedio de un cromosoma de E. coli en estado replicativo, que es igual a  $3.5 \times 10^9$  dal [1.4 veces el tamaño del cromosoma en reposo (24)]. Según el modelo de Cooper y Helmstetter (24), cultivos de E. coli B/r con tiempos de generación de 40 y 35 minutos, tienen de 1 a 2 cromosomas en forma replicativa; en cultivos con tiempos de generación mayores de 60 minutos, existe un lapso en el que el cromosoma está en reposo y el equivalente genómico promedio es un poco mayor a un cromosoma, y a tiempos de generación entre 25 y 20 minutos, puede haber de 2 a 4 cromosomas que se replican activamente. Esta y otras variables influyen en el estado de replicación de E. coli (24), sin embargo, en ninguno de los trabajos citados, incluyendo el presente, se reportan los tiempos de generación de los cultivos, observándose condiciones de crecimiento diversas, en medios ricos o mínimos, con lo cual, es probablemente impreciso el considerar un tamaño promedio de un cromosoma en estado de reposo; una excepción es el trabajo de Twigg y Sherrat (129) quienes determinaron el número de copias de ColE1 en cultivos amplificados por varias horas en presencia de cloramfenicol, con lo cual, el cromosoma está efectivamente en reposo por el bloqueo en la síntesis de proteínas. A pesar de que sería adecuado definir mas cautelosamente las condiciones de crecimiento, si se emplean cepas crecidas en condiciones iguales, y presentan un comportamiento de crecimiento similar, el valor que se asuma para el cromosoma de E. coli sólo afectará los valores absolutos del número de copias, pero no tendrá una influencia importante en los números de copias relativos entre las diferentes cepas.

Hasta aquí se han discutido algunos aspectos que podrían alterar los resultados de la cuantificación del número de copias de pYK007, y se ha indicado que pueden contribuir en mayor o menor grado con la precisión de los valores determinados. Debe de tomarse en cuenta, que ninguna de las variables discutidas afectaría los resultados produciendo diferencias mayores a una copia por equivalente genómico entre las cepas estudiadas, en condiciones en donde se observaron diferencias de 100 veces en la actividad de ST, por lo cual los datos obtenidos descartan claramente la posibilidad de que el fenómeno de represión catabólica de la actividad de ST se ejerza a nivel de la replicación del pYK007, e indican que las cepas *cya+crp+* así como las *cya<sup>Δ</sup>*, y *crp<sup>Δ</sup>* poseen de 1-2 copias del plásmido pYK007; este número de copias era lo esperado para pYK007 por ser un plásmido autotransferible y de alto peso molecular, los cuales generalmente se encuentran en bajo número de copias (20).

ii) Efecto de las deleciones en *cya* y *crp* sobre la secreción de la enterotoxina ST.

Siendo ST una exotoxina, producida intracelularmente y exportada al medio de cultivo, una posibilidad para la explicación del efecto de represión catabólica de la actividad de ST, es que, en el proceso de secreción de la toxina, existe un paso que está regulado positivamente por el complejo AMPc-proteína receptora del AMPc, por lo que, en ausencia de este complejo, que es el caso para las cepas *cya<sup>Δ</sup>* (en ausencia de AMPc) y *cya<sup>Δ</sup> crp<sup>Δ</sup>*, la toxina no se exporta y se acumula en el interior.

Los resultados obtenidos al ensayar actividad de ST en extractos sonicados de las cepas CA8306 (pYK007) y CA8445 (pYK007), indican que no hay una acumulación intracelular de ST activa en las cepas deficientes en represión catabólica, al tiempo que en el sobrenadante, tampoco se detecta actividad toxigénica (tabla 8), por lo tanto, el hecho de que las cepas *cya<sup>Δ</sup>* y *crp<sup>Δ</sup>* observan

niveles 100 veces mas bajos de actividad toxigénica extracelular con respecto a la cepa silvestre, no se debe a la secreción ineficiente de la toxina activa.

Cuando se generaron extractos sonicados de las cepas CA8000 (pYK007), CA8306 (pYK007), CA8445(pYK007) y J54 (pYK007), y se incubaron a 65°C durante 30 minutos, la actividad de ST determinada en las muestras reveló un efecto de termoactivación en las cepas *cya+* *crp+* con el pYK007 (CA8000 y J54) (tabla 9); en estas cepas, los sonicados mantenidos a a 4°C tuvieron muy poca actividad toxigénica, en comparación con los calentados, en los cuales se detectó un incremento de 64 veces en los niveles de toxina. En contraste, las cepas deficientes en el complejo AMPc-CRP, no mostraron actividad de ST en los sonicados calentados y en los no tratados (tabla 9). No se hicieron termoactivaciones en la cepa *cya*<sup>Δ</sup> en presencia de AMPc, para observar la reversión del efecto de represión catabólica en relación a la termoactivación. Posteriormente se determinó que el fenómeno de termoactivación se ubica en el espacio periplásmico de las cepas *cya+* *crp+* (R. Fonseca., resultados de este laboratorio).

En el contexto de la regulación de la enterotoxina ST por el complejo AMPc-CRP, estos hallazgos indican que la ausencia del complejo mencionado, no resulta en la acumulación de una toxina intracelular, o periplásmica que se active con el suministro de calor; en relación al mecanismo de exportación de la enterotoxina, estos resultados, que muestran un efecto de termoactivación, tienen repercusiones mas interesantes, ya que sugieren la existencia de un precursor inactivo de ST en el periplasma de las cepas *cya+* *crp+* con el plásmido pYK007, lo cual implica que el procesamiento que habilita a la toxina el paso del citoplasma al periplasma, no la activa, y consecuentemente la activación deberá llevarse a cabo en algún momento del paso a través de la membrana externa, cuando se exporta del periplasma al medio de cultivo. Se podría proponer, que el efecto de termoactivación in vitro, es análogo a la acti-

vación (y procesamiento, si los dos procesos están vinculados) in vivo de la enterotoxina ST; a pesar de que con los datos obtenidos no se ha obtenido ninguna evidencia que sustente esta posibilidad, el estudio de este efecto, bajo la premisa mencionada, seguramente generaría datos valiosos en relación al mecanismo de exportación de ST, que hasta ahora se desconoce.

Si bien no se encontró una alteración en la secreción de ST, debida a la acumulación de una toxina intracelular activa, o de un precursor inactivo que exhiba actividad al ser calentado, no se excluye la posibilidad de que el complejo AMPc-CRP regule otros pasos en el mecanismo de secreción de ST. Los resultados de el presente trabajo, son compatibles con la hipótesis de que el efecto de represión catabólica de la actividad de ST se debe, a la regulación de la transcripción de gene de la enterotoxina por el complejo AMPc-CRP; no obstante, no se obtuvieron evidencias que apoyen directamente la hipótesis mencionada.

Un paso en la secreción de ST que pudiese estar sujeto a represión catabólica podría darse a nivel de la enzima responsable del procesamiento y/o activación de ST: Silva y col.(109) aislaron mutantes cromosómicas de E. coli que exhibieron un fenotipo ST<sup>-</sup>, y sugirieron que la mutación probablemente se encontrara en una enzima que procesa a la toxina; asimismo, en este laboratorio se tienen datos que permiten suponer la existencia de una enzima responsable del procesamiento y/o activación de ST. No se sabe si la exportación de ST requiere de otros procesos, como serían un mecanismo de modificación postraduccionaI como en el caso de la lipoproteína (128), o la participación de productos codificados por genes que integran una maquinaria de exportación (84); si fuesen necesarios para la exportación de ST, estos pasos podrían estar regulados por el complejo AMPc-CRP.

En virtud de que no existe ninguna evidencia experimental que apoye directamente que la regulación de ST por el complejo AMPc-CRP se lleve a cabo nivel de transcripción, y de que aún se pueden contemplar varias alternativas para atribuir el efecto de represión catabólica sobre la actividad de la enterotoxina, y cuya examinación no conduciría a la elucidación del papel del complejo AMPc-CRP en la transcripción del gene ST, es necesario enfocar los experimentos futuros hacia la demostración directa de la regulación de la transcripción de ST por dicho complejo. Este objetivo puede lograrse analizando la transcripción in vivo del gene ST en la cepa silvestre y las cepas  $cya^{\Delta}$  y  $crp^{\Delta}$ , en presencia y ausencia de AMPc en condiciones en las que el gene ST sea estable [ya que se ha sugerido que el gene ST en el pYK007 pudiera estar contenido en un transposón (110)], y con el empleo de un sistema de transcripción in vitro, adicionado de AMPc, de la proteína CRP purificada, y del DNA del gene ST. En ambos casos, tanto en la transcripción in vivo, como in vitro, se esperaría encontrar una dependencia de la transcripción del gene ST, por la presencia y acción del complejo AMPc-CRP.

## APENDICE.

### Optimización de condiciones de conteo para $^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ y doble isótopo.

El conteo por líquido de centelleo, es una técnica sensitiva y versátil para la detección y medición de radioactividad. La función de un líquido de centelleo es, la conversión de la energía cinética de las partículas nucleares que atraviezan el medio en fotones de luz, a la máxima eficiencia. La luz es registrada por fotomultiplicadores que generan pulsos eléctricos, cuya señal es discriminada por coincidencia y analizada por circuitos electrónicos integrados en relación a su tiempo y amplitud, y finalmente es registrada y exhibida como cuentas ó cuentas por unidad de tiempo.

Los líquidos o coctéles de centelleo se componen de un solvente y 1, 2 o 3 solutos. Los solutos, conocidos también como centelleadores o fluors, actúan como transductores de luz, convirtiendo energía nuclear en fotones de luz.

Durante el proceso de centelleo, el paso de las partículas nucleares en el líquido de centelleo produce cambios fotofísicos y fotoquímicos. Se pueden distinguir cuatro pasos (95): a) absorción de la energía por el solvente, b) formación de un estado excitado del solvente, c) transferencia de la energía del solvente al soluto y provocación de un estado excitado del soluto y, d) emisión fluorescente por el soluto.

La interferencia o competencia con el orden de progresión de estos eventos, por la presencia de sustancias en la muestra, la muestra misma o el soporte de esta, etc., afecta adversamente la emisión de luz producida por el líquido de centelleo, resultando en un fenómeno de "apagamiento" o "quenching". La corrección de apagamiento o de quenching, es sinónimo de la determinación de la eficiencia de conteo. La eficiencia (E) es definida como la relación de la cuentas por minuto observadas (cpm) a las desintegraciones por minuto (dpm), entonces:  $E = \text{cpm} / \text{dpm}$  .

Debido a que las muestras varían en sus características de quenching, sus eficiencias deben de ser determinadas individualmen-

te; por esta razón, se elaboraron curvas de corrección de quencheo y se optimizaron las condiciones de conteo, para muestras radioactivas en papel filtro.

#### OPTIMIZACION DE LOS CANALES DE $^3\text{H}$ Y $^{14}\text{C}$ .

Como paso preliminar para la corrección de quencheo, se hizo un ajuste de los canales de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , determinandose el óptimo de amplitud (ganancia) para  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  en las muestras en papel. Para este efecto, se prepararon muestras de DNA marcado con  $^3\text{H}$  o con  $^{14}\text{C}$  en papel, por duplicado, con el tratamiento de rutina (sección no. 7 de materiales y métodos); las muestras de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  contuvieron aproximadamente 40,000 cpm y 20,000 cpm, respectivamente. En esta determinación, así como en todos los experimentos, se usó: cuadros de aprox. 2 cm<sup>2</sup> de papel filtro Whatman 3 MM; coctél de tolueno-PPO, 7 ml por vial; viales de centelleo de vidrio (borosilicato); contador Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer modelo 3385.

La muestra de tritio se leyó en el canal indicado, con un discriminador de ventana de 50-1000 (abierta), y la amplificación se modificó en cada lectura tomando valores de 10 % a 100 %, a intervalos de 10 %. Con los datos obtenidos, se graficó cpm v.s. el logaritmo de 1 / % de amplificación; se determinó la altura máxima del pico, que fué de 55 % a 75 %. Se repitió el mismo procedimiento, pero ahora la amplitud se varió en incrementos de 5 %, de 50 % al 90 % de amplificación; el punto máximo promedio de las curvas de amplificación tuvo un valor de 60 %.

De la misma manera se hizo el ajuste de canal para  $^{14}\text{C}$ , primero con amplificaciones de 7 % a 13 % a intervalos de 1 %, y después en el mismo rango de amplificación con incrementos de 0.5 %. En este caso, el máximo de amplificación se obtuvo a 11.5 %.

#### CORRECCION DE QUENCHEO POR EL METODO DE RELACION DE CANALES.

El método de relación de canales se basa en un cambio descendente en el espectro de altura del pulso de un radioisótopo, en la presencia de un "quencher" o elemento apagador. El pico del espectro de altura del pulso, va cambiando hacia el lado de baja energía del espectro, a medida que se aumenta el quencheo en el siste-

ma; si un canal es usado para monitorear la porción baja del espectro y otro canal registra el lado de alta energía del espectro, y, se hace una relación entre estos dos canales cubriendo todo el espectro, se pueden obtener curvas de calibración, relacionando la eficiencia de conteo con la relación de canales. Este método fue introducido por Baille (5) y ha sido modificado por diversos investigadores. El procedimiento que aquí se siguió, es una modificación del método de Baille editada por Packard (14). El procedimiento implica:

- 1) Seleccionar dos canales para contar porciones diferentes y adyacentes del espectro de altura del pulso (canal de conteo y canal de monitoreo).
- 2) Conteo de un juego standard con diferentes quencheos y eficiencias de conteo conocidas para obtener la relación de canales.
- 3) Graficar la relación de canales contra la eficiencia de conteo para obtener las curvas de correlación.
- 4) Determinar la eficiencia de la muestra problema contando en las condiciones de la curva apropiada; con el valor de la relación de canales. encontrar la eficiencia con la curva.

1.- Corrección de quencheo para muestras de  $^{14}\text{C}$  en papel.

El procedimiento se describe a continuación:

1.1) Se empleó un juego de viales standard de  $^{14}\text{C}$  con una actividad específica de  $1 \times 10^5$  dpm (en la fecha de fabricación), con los siguientes quencheos:

vial 1 = 0.0	vial 4 = 0.4	vial 7 = 0.9
vial 2 = 0.2	vial 5 = 0.7	
vial 3 = 0.3	vial 6 = 0.8	

1.2) Se seleccionaron los siguientes parámetros:

a) Canal de monitoreo (monitoreo de quencheo):

Amplificación = 11.5 %    Ventana = ( X - 1000 )

b) Canal de conteo (eficiencia de conteo):

Amplificación = 11.5 %    Ventana = ( 50 - 1000 )

c) Relación de canales:

$$\frac{\text{canal de monitoreo ( x - 1000 )}}{\text{canal de conteo ( 50 - 1000 )}}$$

el límite del canal de monitoreo fué tomando diferentes valores de X :

$X_1 = 500$	$X_4 = 200$	$X_7 = 100$
$X_2 = 400$	$X_5 = 120$	$X_8 = 90$
$X_3 = 300$	$X_6 = 110$	$X_9 = 80$

1.3) Fijadas las condiciones en los canales, se contó todo el juego standard para cada valor de X, 1 minuto por vial.

1.4) La familia de curvas de quencheo que se muestra en la figura 14 se obtuvo, calculando el porcentaje de la eficiencia de conteo para cada vial contado en el canal 50 - 1000 (canal de conteo), y graficando contra la relación de canales que observó el vial. En la gráfica se aprecia que se obtuvo una recta cuando el límite inferior de la ventana de monitoreo toma un valor de 110; está recta fué considerada como la curva de calibración.

1.5) Las muestras problema de  $^{14}\text{C}$  en papel fueron contadas con las condiciones de la curva de calibración  $(110-1000) / (50-1000)$ , y con la relación de canales que se obtuvo, se encontró el valor correspondiente en la ordenada. La eficiencia de conteo fué de 78 %.

2.- Corrección de quencheo para muestras de  $^3\text{H}$  en papel .

Se realizó como el experimento anterior, con las siguientes diferencias:

2.1) El juego viales standard de  $^3\text{H}$ , contenía  $1 \times 10^6$  dpm con valores de quencheo:

vial 1 = 0.0	vial 4 = 0.4	vial 7 = 0.8
vial 2 = 0.1	vial 5 = 0.6	
vial 3 = 0.3	vial 6 = 0.7	

2.2) a) Canal de conteo:

Amplificación = 60 %      Ventana = ( 50 - 1000 )

b) Canal de monitoreo:

Amplificación = 60 %      Ventana = ( X - 1000 )

c) Canal de monitoreo:

Amplificación = 60 %      Ventana = ( 50 - X )

d) Relación de canales:

$$\frac{(X - 1000)}{(50 - X)}$$

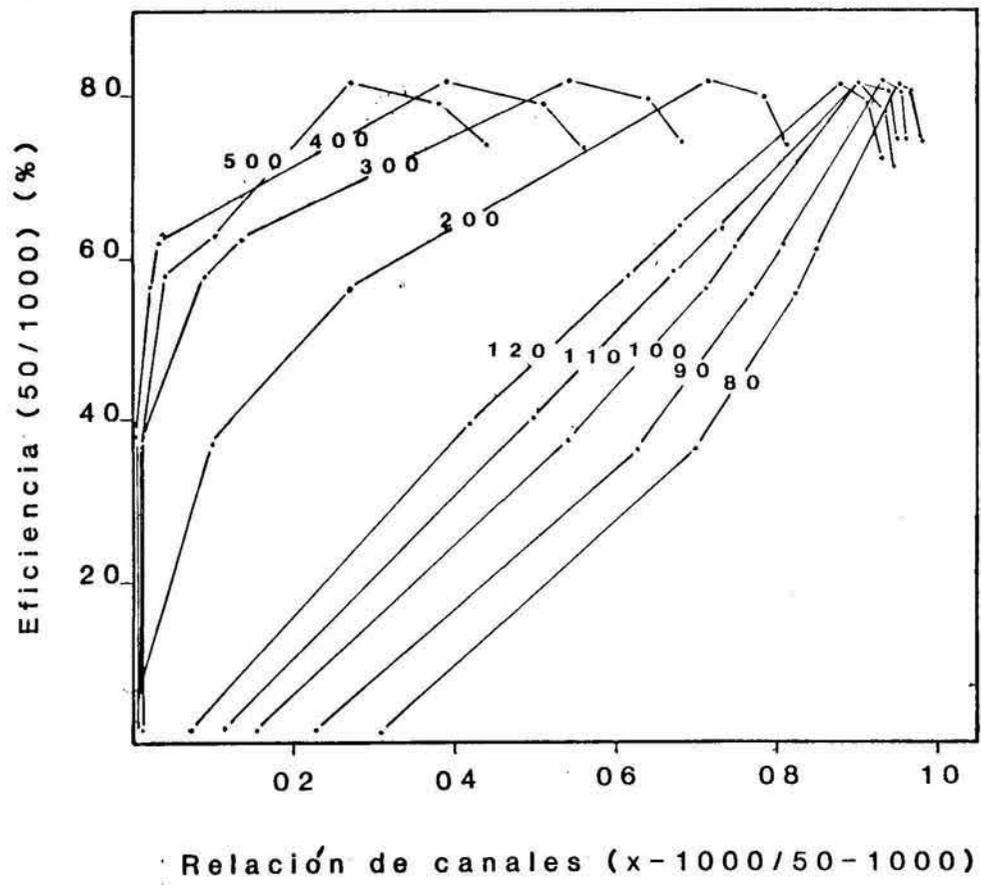
en donde, X =

$X_1 = 250$	$X_4 = 90$	$X_7 = 60$	$X_{10} = 55$
$X_2 = 150$	$X_5 = 80$	$X_8 = 65$	
$X_3 = 100$	$X_6 = 70$	$X_9 = 59$	

FIGURA 14. Familia de curvas de corrección de quencheo para  $^{14}\text{C}$ .

Las curvas fueron trazadas con los datos obtenidos del conteo de un juego standard de  $^{14}\text{C}$ , con eficiencias de conteo conocidas y diferentes quencheos, aplicando el método de relación de canales como lo indica el texto.

La curva obtenida cuando el límite inferior de la ventana de monitoreo tomó un valor de 110, fué la curva de calibración considerada. La flecha sobre esta curva, indica la posición de la muestra problema, al interpolar su valor de relación de canales, con el, cual se obtuvo la eficiencia de conteo para la muestra.



2.3) De la familia de curvas de la figura 15, se tomó como la curva de calibración, la que fué mas recta, es decir la obtenida cuando  $X = 70$ .

2.4) La eficiencia obtenida para las muestras de  $^3\text{H}$  en papel filtro con la curva de calibración anterior, fué de 32 %.

3.- El cálculo de la actividad real o dpm reales de los juegos standard usados se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$A = A_0 e^{-0.693 t / T_{1/2}}, \quad \text{donde;}$$

A = actividad específica de la muestra, despues de un tiempo transcurrido.

$A_0$  = actividad de la muestra al tiempo original

e = base de los logaritmos naturales

t = tiempo transcurrido

$T_{1/2}$  = vida media del isótopo

La actividad real para el juego de  $^3\text{H}$  fue de 735,200 dpm, y para el juego de  $^{14}\text{C}$  se obtuvo, 99,931 dpm

Por último se calculó la eficiencia del aparato con la expresión  $E = \text{cpm} / \text{dpm}$ ; tomando las dpm reales de los juegos arriba determinados y contando el vial con 0.0 de quencheo en toda la ventana con la amplificación apropiada de donde se obtienen las cpm.

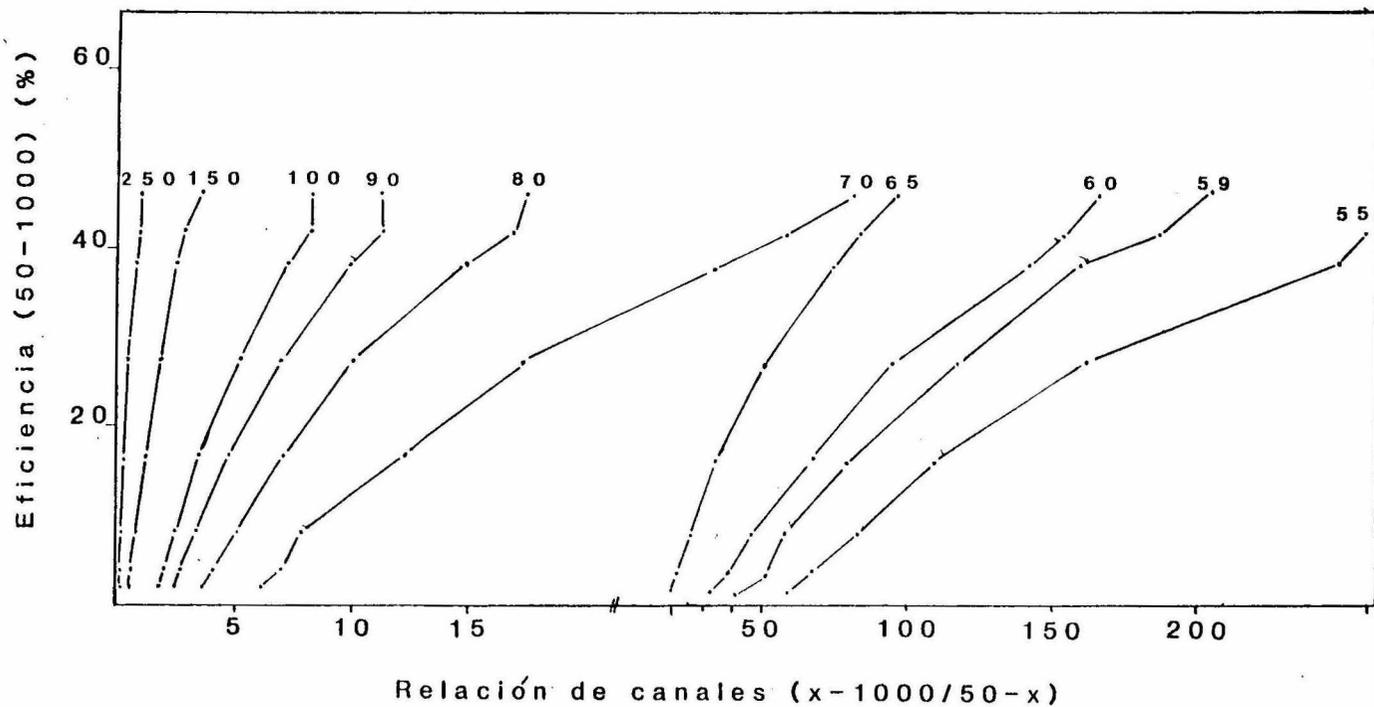
#### DETERMINACION DE CONDICIONES DE CONTEO SIMULTANEO PARA $^3\text{H}$ Y $^{14}\text{C}$ .

Cuando se cuentan simultáneamente  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  en toda la ventana se observa que tienen un espectro de energia diferente, sin embargo existe una zona en donde ambos espectros se sobreponen; en consecuencia parte de las cuentas de  $^3\text{H}$ , se registran en el canal de  $^{14}\text{C}$ , y viceversa. Para poder discriminar el paso de cuentas de un canal hacia otro, las ventanas de cada canal pueden ajustarse, de manera que se establezca un paso controlado, y en base a éste, se pueden asignar de manera fiable las cuentas correspondientes a cada isótopo. También se tomó en consideración, que al cerrar las ventanas para regular el paso de un canal al otro, la eficiencia de conteo disminuye, por lo cual se determinó el factor de corrección para las ambos isótopos.

FIGURA 15. Familia de curvas de corrección de quencheo para  $^3\text{H}$ .

Las curvas fueron trazadas con los datos obtenidos del conteo de un juego standard de  $^3\text{H}$ , con eficiencias de conteo conocidas y diferentes quencheos, aplicando el método de relación de canales como lo indica el texto.

La curva de calibración considerada, fué la obtenida cuando el límite variable del canal de monitoreo tomó un valor de 70. En éstas condiciones se determinó la relación de canales para la muestra problema y se interpoló en la curva de calibración (señalada con la flecha), obteniéndose la eficiencia de conteo para dicha muestra.



Empleando las mismas muestras de DNA marcado con  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$  en papel filtro, las condiciones para conteo simultáneo se establecieron como sigue: Se fijaron las condiciones óptimas para conteo de  $^3\text{H}$  en éste canal (60 %, 50-1000), y las de  $^{14}\text{C}$  en el canal correspondiente (11.5 %, 50-1000). Las muestras de  $^3\text{H}$  se empezaron a contar en el canal de tritio, y se registró el paso al canal de  $^{14}\text{C}$ . Se fué disminuyendo el límite superior del canal de  $^3\text{H}$ , en intervalos de 100, y simultáneamente, se fué cerrando la ventana de  $^{14}\text{C}$  variando el límite inferior en intervalos de 20; a cada movimiento se registró el paso de cuentas del canal de  $^3\text{H}$  al de  $^{14}\text{C}$ , y se encontró el valor del límite superior del canal de  $^3\text{H}$ , tal, que sólo pasaban el 0.1% de las cuentas de  $^3\text{H}$  al canal de  $^{14}\text{C}$ . Con las aperturas de ventana encontradas previamente, se inició el conteo de las muestras de  $^{14}\text{C}$ , se registró el paso de cuentas al canal de  $^3\text{H}$ , y cerrando el límite inferior de la ventana de  $^{14}\text{C}$ , se encontró un paso de 10% de las cuentas del canal de  $^{14}\text{C}$  al de  $^3\text{H}$ ; Una vez encontrados los límites de ventana para el paso deseado de los dos isótopos, se revisaron y se hicieron los ajustes necesarios. Por último, se contaron las muestras de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  con las condiciones de paso definidas y en las condiciones óptimas determinadas para cada isótopo, y con los datos obtenidos se calculó el factor de corrección para compensar la pérdida de cuentas de las muestras y corregir los valores para la eficiencia óptima de conteo. Las condiciones establecidas para el conteo simultáneo de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , fueron:

	AMPLIFI-			FACTOR DE	
	CACION	VENTANAS	PASO	CORRECCION	EFICIENCIA
$^3\text{H}$	60.0 %	50 - 272	a $^{14}\text{C}$ = 0.1 %	1.8461	32 %
$^{14}\text{C}$	11.5 %	221 - 1000	a $^3\text{H}$ = 10.0 %	1.5172	78 %

## REFERENCIAS.

- 1.- Adelberg, E.A., y J. Dittard. 1965. Chromosome transfer in bacterial conjugation. *Bacteriol. Rev.* 29:161-172.
- 2.- Aimoto, S., T. Takao, Y. Shimonishi, S. Hara, T. Takeda, Y. Takeda y T. Miwatani. 1982. Amino-acid sequence of a heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 129:257-263.
- 3.- Alderete, J.F. y P.C. Robertson. 1977. Repression of heat-stable enterotoxin synthesis in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 17:629-633.
- 4.- Alderete, J.F. y D.C. Robertson. 1978. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *E. coli*. *Infect. Immun.* 19:1021-1030.
- 5.- Baillie, L.A. 1960. *Inter. J. applied. Rad. and Isotopes.* 8:1.
- 6.- Bauer W., y J. Vinograd. (1968). The interaction of closed circular DNA with intercalating dyes. I. The superhelix density of SV40 DNA in the presence and absence of dye. *J. Mol. Biol.* 33: 141.
- 7.- Bazaral, M., y D.P. Helinski. 1968. Circular DNA forms of colicinogenic factors E1, E2 and E3 from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 36:185-194.
- 8.- Bazaral, M. y D.R. Helinski. 1970. Replication of a bacterial plasmid and an episome in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 9:299-406.
- 9.- Bennett, P. 1985. Bacterial transposon. En: "Genetics of bacteria". Scaife, J., Leach, D. y Galizzi A. (Eds.). pp. 97-112. Academic Press (London). LTD.
- 10.- Betley, M.J., V.L. Miller, y J.J. Mekalanos. 1986. Genetics on bacterial enterotoxins. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:577-605.
- 11.- Beyreuther, K. 1978. Chemical structure and functional organization of the lac repressor from *Escherichia coli*. The Operon. pp. 123-154. Miller, J.H., y Reznikoff, W.S. (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory.
- 12.- Brickman, E., L. Soll, y J. Beckwith. 1973. Genetic characterization of mutations which affect catabolite sensitive operons in *Escherichia coli* including deletions of the gene for adenyl cyclase. *J. Bacteriol.* 116:582-587.

- 13.- Bodner, W. F., y S. Grether. 1965. Uptake and incorporation of thymine, thymidine, uracil, uridine, and 5-fluoro uracil into the nucleic acids of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 89:1011-1019.
- 13a- Boezi, J.A., y R.I. Armstrong. 1967. Chromatography of nucleic acids on nitrocellulose columns. Methods in Enzymology vol. 12A. pp. 684-686. Grossman, L., y Moldave, K. (Eds.). Academic Press. New York.
- 14.- Boletín Técnico num 15. (1965). Packard.
- 15.- Botsford, J.L., y M. Drexler. (1978). The cyclic 3',5'-adenosine monophosphate receptor protein and regulation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate synthesis in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 165:47-56.
- 16.- Boyce, R.P. y R. B. Setlow. 1962. A simple method of increasing the incorporation of thymidine into the deoxyribonucleic acid of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 61:618-620.
- 17.- Burgess, M.N., R.J. Bywater, C.M. Cowley, N.A. Mullan y P.M. Newsome. 1978. Biological evaluation of a methanol-soluble heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs rabbits and calves. Infect. Immun. 21:526-531.
- 18.- Burgess, R.R. 1975. Purification and physical properties of E. coli RNA polymerase. RNA Polymerase. Losick, R. y Chamberlin, M. (Eds.). pp. 69-100. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 19.- Burton, K. 1968. Determination of DNA concentration with diphenylamine. Methods in enzymology. Vol. XII. pp. 163-166 Academic Press.
- 20.- Cervantes Vega, C. 1978. Replicación del factor colicínico El durante el ciclo celular de Escherichia coli. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN. pp. 26 y 27.
- 21.- Chan, S.K. y R.A. Gianella. 1981. Amino-acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by E. coli pathogenic for man. J. Biol. Chem. 256: 7744-7746. ver 13a.
- 22.- Chamberlin, M.J. 1975. Interactions of RNA polymerase with the DNA template. RNA Polymerase. Losick, R. y Chamberlin, M. (Eds.). pp. 159-191. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 23.- Clements, J.D., R.J. Yancey y R.A. Finkelstein. 1980. Properties of homogeneous heat-labile enterotoxin from Escherichia coli. Infect. Immun. 29:91-97.

- 24.- Cooper, S., y C.E. Helmstetter. 1968. Chromosome replication and the division cycle of E.coli. B/r. J. Mol. Biol. 31:519-540.
- 25.- Covarrubias, L., L. Cervantes, A. Covarrubias, X. Soberon, I. Vichido, A. Blanco, Y.M. Kupersztoch-Portnoy, y F. Bolivar. 1981. Construction and characterization of new cloning vehicles V. Mobilization an coding properties of pBR322 and several deletion derivaties incuding pBR327 and pBR328. Gene. 13:25-35.
- 26.- Costerton, C. 1974. Structure and function of the cell envelope of gram negative bacteria. Bacteriol. Rev. 38:87-110
- 27.- Cozzarelli, N., R. Kelly y A. Koruberg. 1968. A minute circular DNA from E.coli. Proc. Natl. Acad. Sci. 60:992-999.
- 28.- Cress, E.D., y B.C. Kline. 1976. Isolation and characterization of E.coli. chromosomal mutants affecting plasmid copy number. J. Bacteriol. 125:635-642.
- 29.- Crombrugge, de B., S. Busby, y H. Buc. (1984). Cyclic AMP receptor protein: Role in transcription activation. Science. 224:831-838.
- 30.- Dallas, W.S. y S. Falkow. 1979. The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of Echerichia coli. Nature. 288:499-501.
- 31.- Datta, N., y J. Olarte. 1974. R factors in strains of Salmonella typhi and Shigella dysenteria 1 isolated during epidemics in México: classification by compatibility. Antimicro. Agents Chemother. 5:310-317.
- 32.- De Wilde, M., M. Ysebaert y N. Harford. 1981. DNA sequence of the STA2 enterotoxin gene from an E. coli strain of human origin. Comunicación personal de J. Kupersztoch con N. Harford.
- 33.- Dean, A. G., Y.C. Ching, R.G. Williams, y J.B. Harden. 1972. Test of E.coli enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis. 125:407-411.
- 34.- Dickson, R.C., J. Abelson, P. Johnson, W.S. Reznikoff, y W.M. Barnes. (1977). Nucleotide sequence changes produced by mutations on the lac promoter of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 111:65-75.

- 35.- Ebright R.W., P. Cossart, B. Gicquel-Sanzey, y J. Beckwith. (1984). Molecular basis of DNA sequence recognition by the catabolite gene activator protein: Detail inferences from three mutations that alter DNA sequence specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:7274-7278.
- 36.- Eilen, E., y J.S. Krakow. (1977). Cyclic AMP-mediated intersubunit disulfide crosslinking of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 114:47-60.
- 37.- Elwell, M.R., y P.L. Shipley. 1980. Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:465-496.
- 38.- Engelsberg, E., y G. Wilcox. (1974). Regulation: Positive Control. *Annu. Rev. Genet.* 8:219.
- 38a- Evans, D.F., D.F. Evans, Jr., y N.F. Pierce. 1973. Difference in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 7:873-880.
- 39.- Field, M., L.H. Graf, W.J. Laird y P.L. Smith. 1978. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: *in vitro* effects on guanylate cyclase activity, cGMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:2800-2804.
- 40.- Finnegan, J., y D. Sherrat. 1982. Plasmid ColE1 conjugal mobility: the nature of *bom*, a region required in *cis* for transfer. *Mol. Gen. Genet.* 185:344-351.
- 41.- Frantz, J. y D.C. Robertson. 1981. Immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins: development of a radioimmunoassay specific for heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity. *Infect. Immun.* 33:193-8.
- 42.- Frey, J., M. Chandler, y L. Caro. 1979. The effects of an *Escherichia coli* *dna ts* mutation on the replication of the plasmids ColE1, pSC101, R100.1 and RTF-Tc. *Mol. Gen. Genet.* 174:117-126.
- 42a- Friesen, J.D. 1968. Measurement of DNA synthesis in bacterial cells. *Methods in Enzymology* vol. 12B. Grossman, L. y Moldave, K. (Eds.). pp. 625-635. Academic Press. New York.
- 43.- Gelfand, H.D., H.M. Shepard, P.H. O'Farrell, y B. Polisky, 1978. Isolation and characterization of a ColE1-derived plasmid copy-number mutant. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75:5869-5873.

- 44.- Gianella, R.A. y K.W. Drake. 1979. Effect of purified Escherichia coli heat-stable enterotoxin in intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion. Infect. Immun. 24:19-23
- 45.- Gianella, R.A., K.W. Drake y M. Luttrell. 1981. Development of a radioimmunoassay for Escherichia coli heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling mouse bioassay. Infect. Immun. 33:186-192.
- 46.- Gilbert, W. (1976). Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. RNA polymerase. R. Losick, y M. Chamberlin, (Eds.). pp. 193-205. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 47.- Goebel, W., y H. Schreupt. 1972. Isolation of minicircular deoxyribonucleic acids from wild strains of E.coli. and their relationship to other bacterial plasmids. J. Bacteriol. 111:696-704.
- 48.- Gornal, G.A., C.J. Bardawill, y M.M. David. 1949. Determination of Serum proteins by means of the Biuret reaction. J. Biol. Chem. 177:751-766.
- 49.- Grodzicker, T, R.R. Arditti y H. Eisen. (1972). Establishment of repression by lambdaoid phage in catabolite activator protein and adenylate cyclase mutants of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. 69:366.
- 50.- Grossman, A., J. Erickson y C. Gross. 1984. The HtpR gene product of E. coli is a factor for heat-shock promoters. Cell. 38:383.
- 51.- Guidi-Rontani, C., A. Danchin. y A. Ullmann. (1980). Catabolite repression in Escherichia coli mutants lacking cyclic AMP receptor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:5799-5801.
- 52.- Guiney, D.G., y C.G. Davies. 1975. Isolation of plasmid DNA from 2 strains of Bacteroid. J. Bacteriol. 124:503.
- 53.- Gyles, C.L., M. So, y S. Falkow. 1974. The enterotoxin plasmids of Escherichia coli. J. Infect. Dis. 130:40-49.
- 54.- Harwood, C.R. y E. Meynell. (1975). Cyclic AMP and the production of sex pili by Escherichia coli K-12 carrying derepressed sex factors. Nature. 254:628.
- 55.- Hayes, W. 1953. The mechanism of genetic recombination in E. coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 18:75.

- 56.- Helinski, D.R., M.A. Lovett, P.H. Williams, L. Katz, J. Collis, Y.M. Kuperzstoch-Portnoy, S. Sato, R.W. Leavitt, R. Sparks, V. Hershfield, D.G. Guiney, y D. Blair. 1975. Modes of plasmid DNA replication in *E.coli*. pp. 514-536. M. Goulian y D. Hanamalt (Editores). DNA Synthesis and its regulation. ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Vol. 3. W.A. Benjamin, Meulo Park. Calif.
- 57.- Hong, J.-S., G. Smith y B.N. Ames. (1971). Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate concentration in the bacterial host regulates the viral decision between lysogeny and lysis Proc. Natl. Acad. Sci. 68:2258.
- 58.- Jacks, T.M. y B.J. Wu. 1974. Biochemical properties of *E. coli* low-molecular-weight, heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 9:342-347.
- 59.- Jacob, A.E., J.A. Shapiro, L. Yamamoto, D.I. Smith, S.N. Cohen, y O. Berg. 1977. Plasmid studied in *Escherichia coli* and other enteric bacteria. pp. 607-768. DNA Insertion elements, plasmids and Episomes. Bukhari A.L., Shapiro J.A. y Adhya, S.L. (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor N.Y.
- 60.- Jacob, F., S. Brenner y F. Cuzin. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:329.
- 61.- Kapitany, R.A., G.W. Forsyth, A. Scott, S.F. McKenzie y R.W. Worthington. 1979. Isolation and partial characterization of two different heat-stable enterotoxins produced by bovine and porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 26:173-179.
- 62.- Katz, L., D.T. Kingsbury, y P.R. Helinski. 1973. Stimulation by Cyclic Adenosil Monophosphate of plasmid deoxyribonucleic acid replication and Catabolite Repression of the plasmid deoxyrrbonucleic acid-protein relaxation complex. J. bacteriol. 114:577-591.
- 63.- Kennedy, D.J., R.N. Greenberg, J.A. Dunn, R. Abernathy, J. Ryerse y R.L. Guerrant. 1984. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins on intestines of mice, rats, rabbits, and piglets. Infect. Immun. 46:639-643.
- 64.- Kontomichalou P., M. Mitani, y R. C. (1970). Circular R- factors molecules controlling penicillinase synthesis, replicating in *E. coli* under either relaxed or stringent control. J. Bacteriol. 104: 34

- 65.- Kupersztoch-Portnoy, Y.M y D.R. Helinski. 1973. A catenated DNA molecule as an intermediate in the replication of the resistance transfer factor R6K in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54:1451-1459.
- 66.- Kupersztoch-Portnoy, Y.M., M. A. Lovett, y D.R. Helinski. 1974. Strand and site specificity of the relaxation event for the relaxation complex of the antibiotic resistance plasmid R6K. Biochemistry. 13:5484-5490.
- 67.- Kupersztoch-Portnoy, Y.M., G.L.G. Miklos, y D.R. Helinski. 1974. Properties of the relaxation complexes of supercoiled deoxyribonucleic acid and protein of the R plasmids R64, R28K y R6K. J. Bacteriol. 120:545-548.
- 68.- Lallier, R., F. Bernard, M. Gendreau, C. Lazure, N.G. Seidah, M. Chretien y S. St. Pierre. 1982. Isolation and purification of E. coli heat-stable enterotoxin of porcine origin. Anal. Biochem. 127:267-275.
- 69.- Lallier R., S. Lariviere y S. St. Pierre. 1980. Escherichia coli heat-stable enterotoxin: rapid method of purification and some characteristics of the toxin. Infect. Immun. 28:469-474.
- 70.- Lathe, R., P. Hirth., M. De Wilde, N. Harford y J.P. Lecocq. 1980. Cell-free synthesis of enterotoxin of E. coli from a cloned gene. Nature (London). 284:473-474.
- 71.- Lederberg, J., L.L. Cavalli y E.M. Lederberg. 1952. Sex compatibility in E. coli. Genetics. 37:720.
- 72.- Lockwood, D.E. y D.C. Robertson. 1984. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Escherichia coli heat-stable enterotoxin (STA). J. Immunol. Meth. 75:295-307.
- 73.- Lovett M., Katz, L. y Helinski D. R. (1974). Unidirectional replication of plasmid Col E1 DNA and relation of the origin-terminus to the nicked site in the Col E1 relaxation complex. Nature 251: 337 .
- 74.- Lovett, M.A., y D.R. Helinski. 1975. Relaxation complexes of plasmid DNA and protein. II. Characterization of the proteins associated with the unrelaxed and relaxed complexes of plasmid ColE1. J. Biol. Chem. 250:8790-8795. add 14
- 75.- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

- 76.- Magasanik, B. (1970). Glucose effects: Inducer exclusion and repression. The Lactose Operon. J. R. Beckwith and D. Zipser (Eds.). pp. 189-219. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 77.- Majerfeld, I.H., D. Miller, E. Spitz, y H.V. Rickenberg. (1981). Regulation of the synthesis of adenylate cyclase in Escherichia coli by the cAMP-receptor protein complex. Mol. Gen. Genet. 181:470-475.
- 78.- Majors, J. (1975). Initiation of in vitro mRNA synthesis from the wild type lac promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. 72:4394.
- 79.- Mandecki, W. y M.H. Caruthers. 1983. Mutants of the lac promoter with large insertions and deletions between CAP binding site and the -35 region. Gene. 31:263.
- 80.- Martínez Cadena, M.G. 1979. Purificación parcial y estudios de regulación de la enterotoxina ST de Escherichia coli. Tesis de Maestría. CINVESTAV. pp. 38-51.
- 81.- Makmonn, R.S., y E.W. Sutherland. (1965). Adenosine 3',5' phosphate in Escherichia coli. J. Biol. Chem., 240:1309-1314.
- 82.- Menzel, R., y M. Gellert. 1983. Regulation of the genes for E. coli DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. Cell. 34:105.
- 83.- Meyers, J.A., D. Sanchez, L.D. Elwell, y S. Falkow. 1976. Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 127:1529-1537.
- 84.- Michaelis, S., y J. Beckwith. 1982. Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in Escherichia coli. Ann. Rev. Microbiol. 36:435-465.
- 85.- Miller, J.H. 1972. Apendix I. Experiments in molecular genetics. pp. 433. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 86.- Monod, J. (1947). The phenomenon of enzymatic adaptation and its bearing of problems of genetics and cellular differentiation. Growth Symposium. 11:223-289. (cita 115 en 130).
- 87.- Moseley, S.L., I. Huq, A. Alim, M. So, M. Samadpour-Motalebi y M. Falkow. 1980. Detection of enterotoxigenic E. coli by DNA colony hybridization. J. Infect. Dis. 142:892-898.

- 87a- Moseley, S.L., J.W. Hardy, M.I. Huq, P. Echeverria y S. Falkow. 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun. 39:1167-1174.
- 88.- Muesing, M.J. Tamm, H.M. Shepard, y B. Polisky. 1981. A single base-pair alteration is responsible for the DNA over production phenotype of a plasmid copy-number mutant. Cell. 24:235-242.
- 89.- Mulligan, M.E., D.K. Hawley, R. Estriken, W.R. McClure. (1984). Escherichia coli promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity. Nucl. Acids Res. 12:789-800.
- 91.- Nordstrom K. 1985. Control of plasmid replication: theoretical considerations and practical solutions. Plasmid in bacteria. Helinski, D.R., Cohen, S.N., Clewell, D.B., Jackson, D.A., y Hollaender, A. (Eds.). pp. 189-214. Plenum Press. New York and London.
- 92.- Nordstrom, K., L. Ingram, y A. Lundback. 1982. Mutations in R Factors of E.coli causing an increased number of R-factor copies per chromosome. J. Bacteriol. 110:562-569.
- 93.- Novick, R.P., R.C. Clowes, S.N. Cohen, R. Curtis III, N. Datta y S. Falkow. 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. Bacteriol. Rev. 40:168-189.
- 94.- Pastan, I., y S. Adhya. (1976). Cyclic adenosine 5'-monophosphate in Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 40:527-551.
- 95.- Peng, C.T. Scintillation processes. 1977. Review 17. pp. 7-12. Sample preparation in liquid scintillation counting. Amersham.
- 96.- Pickens, R.N., A.J. Mazaitis, S. Saadi, y W.K. Maas. 1984. Characterization of the basic replicons of the chimeric R/Ent plasmid pCG86 and the related Ent plasmid P307. Plasmid. 12:10-18.
- 97.- Pribnow, D. (1975). Bacteriophage T7 early promoters: Nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. J. Mol. Biol. 99:419.
- 98.- Rachmeler, M., J. Gerhart, y J. Rosner. 1961. Limited thymidine uptake in Escherichia coli due to an inducible thymidine phosphorilase. Biochim. Biophys. Acta. 49:222-225.
- 99.- Radloff R., W. Bauer, y J. Vinograd. (1967). A-dye-bouyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in Hela cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 57: 1514 .

- 100.- Raibaud, O., y M. Schwartz. (1984). Positive control of transcription initiation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 18:173-206.
- 101.- Rao, M.C., S.A. Orellana, M. Field, D.C. Robertson y R.A. Gianella. 1981. Comparison of the biological actions of three purified heat-stable enterotoxins: effects on ion transport and guanylate cyclase activity in rabbit ileum *in vitro*. *Infect. Immun.* 33:165-170.
- 102.- Reznikoff, W.S., y J.N. Abelson. (1978). The *lac* promoter, The Lactose Operon. J.H. Miller and W.S. Reznikoff (Eds.). pp. 221-243. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 103.- Reznikoff, W.S. y W.R. McClure. 1986. *E. coli* promoters. Maximizing gene expression. Reznikoff, W. y Gold, L. (Eds.). pp. 1-34. Butterworth Publishers.
- 104.- Robledo Serna, R. 1983. Expresión del gene EntST en un sistema de minicélulas de *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. pp. 2-5.
- 105.- Rosenberg, M., y D. Court. (1979), Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* 13:39-53.
- 106.- Rush, M.G., C.N. Gordon, y R.C. Warner. 1969. Circular deoxyribonucleic acid from *Shigella Dysenteriac* Y6R. *J. Bacteriol.* 100:803-808.
- 107.- Sabourin, D., y J. Beckwith. 1975. Deletion of the *Escherichia coli* *crp* gene. *J. Bacteriol.* 122:338-340.
- 108.- Sankar A. y S. Garges. (1982). How cAMP and its receptor protein act in *E. coli*. *Cell.* 29:289.
- 109.- Silva, M., W.K. Mass. y C.L. Gyles. 1978. Isolation and characterization of enterotoxin deficient mutants of *E.coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:1384-1388.
- 110.- Silva Sánchez J. 1984. Regulación de la Transposición. Tesis de Licenciatura. Enep-Iztacala. U.N.A.M. pp. 11-12.
- 111.- Smith, M.D., y W.R. Guild. 1979. A plasmid in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 137:735-739.
- 112.- Smith, H.W. y S. Halls. 1967. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Pathol. Bacteriol.* 93:531-543.

- 113.- So, M., J.H. Crosa, y S. Falkow. 1975. Polynucleotide sequence relationships among Ent plasmids and relationship between Ent and other plasmids. *J. Bacteriol.* 121:234-238.
- 114.- So, M., F. Heffron, y S. Falkow. 1978. Method for the genetic labeling of criptic plasmids. *J. Bacteriol.* 133: 1520.
- 115.- So, M., F. Heffron, y B.J. McCarthy. 1979. The *E. coli* gene encoding heat stable toxin is a bacterial transposon flanked by inverted repeats of IS1. *Nature.* 277:353-456.
- 116.- So, M. y B.J. McCarthy. 1980. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn 1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *E. coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:4011-4015.
- 117.- Som, T., y J. Towizawa. 1983. Regulating regions of ColE1 that are involved in determination of plasmid copy-number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:3232-3236.
- 118.- Spratt, B.G., y R.J. Rowbury. 1973. The plasmid of *Salmonella typhimurium* LT2. *Microb. Gen. Genet.* 121:347.
- 119.- Squires, C.L., F.D. Lee y C. Yanofsky. 1975. Interactions of the trp repressor and RNA polymerase with trp operon. *J. Mol. Biol.* 92:93.
- 120.- Staples, S.J., S.E. Asher y R.A. Gianella. 1980. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of *E. coli* pathogenic for man. *J. Biol. Biochem.* 255:4716-4721.
- 121a- Takahashi, M., B. Blazy, y A. Baudras. (1980). An equilibrium study of the cooperative binding of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate to the adenosine cyclic 3'.5'-monophosphate receptor protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 19:5124-5130.
- 121.- Stieglitz, H., R. Fonseca, J. Olarte, y Y.M. Kupersztoch-Portnoy. 1980. Linkage of heat-stable enterotoxin activity and ampicilin resistance in a plasmid isolated from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* 30:617-620
- 122.- Takao, T., T. Hitouji, S. Aimoto, Y. Shimonishi, S. Hara, T. Takeda, Y. Takeda y T. Miwatani. 1983. Amino-acid sequence of a heat-stable enterotoxin isolated from enterotoxigenic *E. coli* strain 18D. *FEBS Lett.* 152:1-5.

- 123.- Takeda, Y., T. Takeda, T. Miwatani, S. Aimoto, H. Ikemura, H. Watanabe, S. Yoshimura, M. Miki y Y. Shimonishi. 1983. Chemical synthesis of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins (STh and STp) and their biological properties. Nineteenth Joint Conference on Cholera. pp. 87-88.
- 124.- Tao, M., y F. Lipmann. (1969). Isolation of adenylyl cyclase from *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73:86-92.
- 125.- Thomas, P.S., y M.N. Farquhar. 1978. Specific measurement of DNA in nuclei and nucleic acids using diaminobenzoic acid. Anal. Biochem. 89:35-44.
- 126.- Thompson, M.R. y R.A. Gianella. 1985. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. Infect. Immun. 47:834-836.
- 127.- Timmis, K., y U. Winkler. 1973. Gene dosage studies with pleiotrophic mutants of *Serratia marcescens* super active in the synthesis of marcescins A and certain other exocellular proteins. Mol. Gen. Genet 124:207-217.
- 128.- Tokunaga, M., H. Tokunaga, y H. Wu. 1982. Post-translational modification and processing of *E.coli* prolipoprotein *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:2255-2259.
- 129a- Towizawa, J., y T. Itoh. 1981, Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA with primer transcript. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:6096-6100.
- 129.- Twigg, J.A., y D. Sherrat. 1980. Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColE1. Nature. 283:216-220.
- 130.- Ullmann, A., y A. Danchin. (1983). Role of cyclic AMP in bacteria. Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vol 15. P. Greengard and G. A. Robison (Eds.). pp. 1-53. Raven Press, New York.
- 131.- Ullmann, A., E. Joseph, y A. Danchin. (1979). Cyclic AMP as a modulator of polarity in polycistronic transcriptional units. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:3194-3197.
- 132.- Ullmann, A., G. Contesse, M. Crepin, F. Gros, y J. Monod. (1969). Cyclic AMP and catabolite repression in *Escherichia coli*. The Role of Adenylyl Cyclase and Cyclic 3',5' AMP in Biological Systems, Vol. 4, pp. 215-231. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

- 133.- Vinograd J., J. Lebowitz, R. Radolff, R. Watson, y P. Lai-  
pis. (1965). The twisted circular form of Polyoma viral  
DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 53: 1104 .
- 134.- Vinograd, J. y J. Lebowitz. 1966. Physical and topological  
properties of circular DNA. J. Gen. Physiol. 49:103.
- 135.- Von Hippel, P.H., D.G. Bear, W.D. Morgan y J.A. McSwiggen.  
1984. Protein-nucleic acid interactions in transcription: a  
molecular analysis. Ann. Rev. Biochem. 53:389-446.
- 136.- Warren, G.J., A. Twigg, y D.J. Sherrat. 1970. ColE1 plas-  
mid mobility and relaxation complex. Nature. 274:259-261.
- 137.- Weil R., Vinograd J. (1963) The cyclic helix an cyclic coil  
forms of polyoma viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 50:730.
- 138.- Willets, N. 1981. Sites and systems for conjugal DNA  
transfer in bacteria. Molecular Biology, Pathogenicity,  
and Ecology of bacterial plasmids. Levy, S.B., Clowes, R.C.  
y Koenig, E.L. (Eds.). pp. 207-215. Plenum Press. New York.
- 139.- Willets, N. y B. Wilkins. 1984. Processing of plasmid DNA  
during bacterial conjugation. Microbiol. Rev. 48:24-41.
- 140.- Wu, F.Y.H., K. Nath, y C. Wu. (1974). Conformational  
transition of cyclic adenosine monophosphate receptor  
protein of E. coli, a fluorescent probe study.  
Biochemistry 13:2567.
- 141.- Zeutheu, J., y M.L. Pato. 1971. Replication of the F'lac  
sex factor in the cell cycle of E.coli. Mol. Gen. Genet.  
111:242-255.
- 142.- Zubay, G., Schwartz, D., y Beckwith, J. (1970). Mechanism  
of activation of catabolite-sensitive genes: A positive  
control system. Proc. Natl. Acad. Sci. 66:104.