



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"**

B0159/84

Ej. 2

REGULACION DE LA TRANSPOSICION

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de
LICENCIADO EN BIOLOGIA

p r e s e n t a

JESUS SILVA SANCHEZ

Los Reyes Iztacala

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

TESIS DE LICENCIATURA

"REGULACION DE LA TRANSPOSICION"

(EN LA BACTERIA Escherichia coli)

JESUS SILVA S.

A LA MEMORIA DE MI PADRE JESUS

A MI MADRE ANTONIA

A MIS HERMANAS AMPARO Y NELLY

A LA FAMILIA

A MIS AMIGOS

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL DEPARTA-
MENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL
CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO
NACIONAL, BAJO LA DIRECCION DEL
DR. JACOBO KUPERZTOCH PORTNOY

AGRADEZCO:

- AL DR. JACOBO KUPERSZTOCH PORTNOY POR LA DIRECCION DEL PRESENTE TRABAJO.

- A LOS M. EN C. DOLORES GRAÑA Y SERGIO VACA POR LA AYUDA OFRECIDA EN LA CONSTRUCCION DEL JUEGO ISOGENICO.

- A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO: AURELIO, CARLOS, HEATHER, LOURDES, LUZ MARIA, RENE, ROCIO.

- A LA SRA. CIDIA URQUIZA POR LA TRANSCRIPCION DEL TRABAJO.

- AL CONACyT POR LA BECA OTORGADA PARA LA REALIZACION DEL TRABAJO.

* * * *

Have you ever thought about living?

* * * *

*Life is a word in which everybody think,
say, shout, and we can only live once,
but what does life mean for you?*

* * * *

What have you done for your own life ?

* * * *

*The most important things for you
are those you have done by yourself.*

* * * *

*Some easy things can be hard for you
and other hard things can be easy for you;
but the most important for you is to say:*

I'VE GOT IT !

Then.... you will be sure that you are living.

* * * *

X E S U S

R E S U M E N

Los transposones son moléculas de DNA capaces de insertarse de un replicón a otro y cuya recombinación es independiente de rec . Estudios previos en el laboratorio, utilizando el transposón de la enterotoxina ST de E. coli, sugirieron que la transposición está regulada por represión catabólica.

Para analizar el efecto de la represión catabólica sobre la transposición se emplearon las mutantes de E. coli en los genes *cya*, *crp* y *lon*. Como modelo de transposición se empleó el plásmido RP4, que confiere resistencia a kanamicina (Km), tetraciclina (Tc) y ampicilina (Ap). Esta última se encuentra en un transposón (Tn1). Las cruces se realizaron entre las cepas *cya*, *crp* y *lon* como donadoras del RP4 y la cepa J54 como receptora, seleccionando para cada antibiótico por separado. De la selección hecha en Ap se obtuvieron dos grupos en un 50% cada uno: a) J54 Ap^r, Km^r, Tc^r y b) J54 Ap^r; en cambio las aisladas en Km y Tc presentaron siempre el fenotipo Ap^r, Km^r, Tc^r.

Sin embargo, al analizar por electroforesis el DNA de las cepas Ap^r encontramos un plásmido de mayor P.M. que el RP4. Tratamos por este mismo método las cepas originales *cya*, *crp* y *lon* sin plásmido RP4, pudiendo detectar la presencia de un plásmido críptico de diferente P.M. para cada cepa.

Para abordar adecuadamente el problema de la transposición nos vimos en la necesidad de construir un juego isogénico de cepas deficientes en represión catabólica. Para esto utilizamos el bacteriófago P1, cml, clr-100 y como cepa receptora la W3110.

I N D I C E

	página
Indice	i
Simbología	iii
Introducción	1
Antecedentes y objetivo	11
Estrategia	12
Material y Métodos	13
Resultados	24
Discusión	50
Bibliografía	53
Figura 1	2
Figura 2	4
Figura 3	8
Figura 4	10
Figura 5	36
Figura 6	42
Figura 7	43
Figura 8	45
Figura 9	47
Tabla 1	14
Tabla 2	25

	página
Tabla 3	26
Tabla 4	27
Tabla 5	28
Tabla 6	30
Tabla 7	31
Tabla 8	32
Tabla 9	33
Tabla 10	34
Tabla 11	38
Tabla 12	49
Gráfica 1	40
Gráfica 2	41

SIMBOLOGIA

Ap	Ampicilina
AMPc	3',5' Adenina monofosfatada cíclica
B1	Vitamina B1 (tiamina)
CIM	Concentración inhibitoria mínima
Cm	Cloranfenicol
Crp	Proteína receptora del AMPc
Cya	Adenilato ciclasa
dal	Daltones
DNA	Acido desoxiribonucleico
F ⁻	Ausencia de factor sexual
Hfr	Alta frecuencia de recombinación
His	Histidina
ilv ^r	Resistencia a isoleucina-valina
Km	Kanamicina
Lac	Lactosa
Leu	Leucina
Lon	Forma alargada debida a la mutación
LUV	Luz ultravioleta
Mal	Maltosa
Mega	Millón (10 ⁶)
Met	Metionina
moi	Multiplicidad de infección
Nal	Acido Nalidixico
P1	Bacteriófago P1

PM	Peso molecular
Pro	Prolina
RP4	Plásmido RP4
ST	Enterotoxina Termoestable
Sm	Estreptomicina (rpsL)
TES	Tris, EDTANa, NaCl.
Tc	Tetraciclina
Thi	Tiamina
Thr	Treonina
Thy	Timidina
Tra	Genes de transferencia
ufp	Unidades formadoras de placa
UK	Unidades Klett
s	Sensibilidad
r	Resistencia

INTRODUCCION

1. PLASMIDOS

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosomal, superheliocoidal y dispensables en las células bacterianas (7), presentan replicación independiente y algunos pueden auto-transferirse de una célula a otra.

Las funciones que se les han adjudicado a los plásmidos hasta la fecha han sido entre otros: Promover la transferencia del material genético (conjugación) por el factor sexual F; algunos plásmidos pueden integrarse a baja frecuencia en el cromosoma bacteriano convirtiendo la cepa en una Hfr (alta frecuencia de recombinación) (22); conferir la resistencia a drogas (factores R) (45) y metales (10); degradar compuestos orgánicos (10); producir bacteriocinas (27); generar tumores en plantas que han sido parasitadas por bacterias (48); producir factores de colonización (30), etc.

2. FACTORES R

Los elementos génicos extracromosómicos responsables de la resistencia a las drogas en bacterias, son llamados factores R. Esta resistencia puede ser única o múltiple y en algunos casos puede ser transferida mediante conjugación por el factor de transferencia a la resistencia

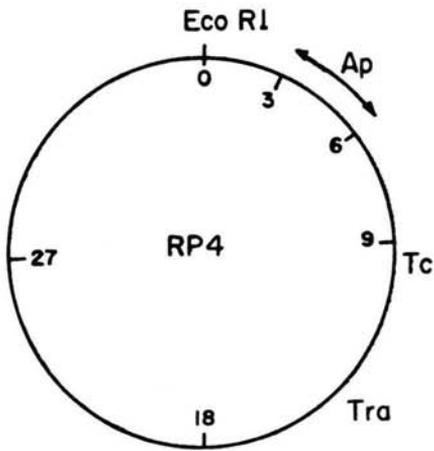


Figura 1. Mapa genético del plásmido RP4 con un peso molecular de 36×10^6 dal. Cada número representa los Megadal tomando como punto de referencia el corte único con Eco R1 (8).

(RTF) (26, 45). Estos plásmidos conjugativos pueden promover en ocasiones la transferencia de material cromosómico. La presencia del "pili" se ha relacionado con la conjugación; este apéndice que aparece en la cepa donadora es codificado por el plásmido y presenta sensibilidad a bacteriófagos, por ejemplo al del tipo I o F (25). En una cepa Hfr R⁺, la frecuencia de la transferencia del cromosoma puede ser reducida a menos del 1% de su valor normal. Los factores R se pueden dividir en dos grandes grupos, de acuerdo a su capacidad de inhibir la fertilidad del factor F (fin⁺) y aquellos que no la inhiben (fin⁻) (46).

3. GRUPOS DE COMPATIBILIDAD

La coexistencia inestable entre diversos plásmidos permite clasificar a éstos en diferentes grupos de compatibilidad. El plásmido RP4 pertenece al grupo P de compatibilidad (12) mientras que el factor F pertenece al grupo F, por lo tanto la coexistencia de ambos plásmidos es estable. El RP4 proviene originalmente de la cepa de Pseudomonas aeruginosa S8 (4). Este factor R, el cual es fin⁻, confiere resistencia a tres antibióticos: ampicilina (Ap), kanamicina (Km) y tetraciclina (Tc) (Figura 1).

4. TRANSPOSICION

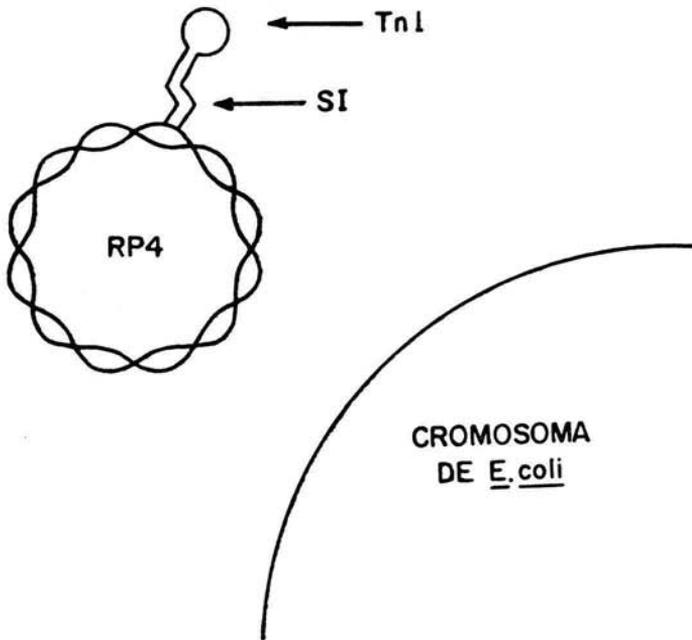


Figura 2. Representación esquemática del transposón Tn1 con secuencias de inserción invertidas (SI), lo cual produce una estructura de "paleta" en estudios de rehibridización (8).

Los transposones son unidades genéticas capaces de "saltar" hacia otros replicones; están constituidos en sus extremos por dos secuencias de inserción IS (8) que pueden o no presentarse invertidas y pueden contener por lo general la información necesaria para conferir resistencia a alguna droga o producción de toxina y la maquinaria para transponerse (transposasas) (11) Figura 2.

Datta y colaboradores (12) observaron que la resistencia a ampicilina del plásmido RP4 la había adquirido el plásmido R64 mediante conjugación; subsecuentemente Richmond y Syker (36) reportaron que el gene de TEM beta-lactamasa (enzima que hidroliza el anillo beta-lactámico de la ampicilina) derivado del plásmido RP1, pudo integrarse al cromosoma de E. coli. Hedges y Jacob (17) aislaron una serie de plásmidos que habían adquirido la resistencia a ampicilina a partir del RP4 encontrando un incremento en el PM. Estos autores concluyeron que la información estructural de la TEM beta-lactamasa estaba contenida en una secuencia de DNA capaz de transponerse denominándola transposón A (TnA). Cabe señalar que este mecanismo de recombinación es independiente de los genes bacterianos de recombinación (rec). Heffron y colaboradores (18) demostraron que la secuencia de nucleótidos del segmento del TnA, con un P M de 3×10^6 dal, era común a una variedad de plásmidos que presentaban la resistencia a ampicilina por el mismo mecanismo.

5. REPRESION CATABOLICA

Se ha observado que la presencia de glucosa en el medio de cultivo de E. coli inhibe la producción de enzimas catabólicas inducibles tal como la beta-galactosidasa (31), la cual degrada la lactosa en glucosa y galactosa; a este fenómeno se le conoce como represión catabólica.

En un sistema enzimático inducible el AMPc revierte la represión catabólica producida por la presencia de la glucosa (13). Pastan (31) encontró que este nucleótido se une a la proteína receptora del AMPc (crp) permitiendo la unión de la RNA polimerasa con el promotor del operón de la lactosa y galactosa para permitir la transcripción de los genes estructurales.

La proteína receptora del AMPc está codificada por el gene crp; mutaciones en este gene aumentan los niveles de AMPc (38). El gene cya es el responsable de la síntesis de la adenil ciclasa, la cual cataliza el paso de ATP a AMPc; mutaciones en este gene impiden la utilización de diversos carbohidratos, este fenotipo se puede revertir si se agrega AMPc al medio de cultivo (6, 32); de esta manera se puede diferenciar una mutante cya de una crp. El papel que juegan estas dos moléculas es regulatorio en sistemas inducibles no esenciales (13, 38).

Guiso y Ullman (16) encontraron que el AMPc y la proteí-

na receptora del AMPc regulan positivamente los genes de la lactosa presentes en un plásmido, esto nos indica que el complejo no actúa exclusivamente en la región cromosómica.

6. MUTACIONES LON Y CRP

La mutación lon (en el cromosoma bacteriano) produce un fenotipo pleitrópico, esto es, sensibilidad a luz ultravioleta (1, 9), mucosidad colonial a baja temperatura (9), filamentación celular (19), deficiencia en degradación de proteínas (15) y baja lisogenia para los fagos P1 y lambda (43). Jergen Schrenk (por comunicación personal) nos ha advertido que una cepa que presenta la mutación crp no es viable si no coexiste con la mutación lon. Además, la primera mutación suprime parcialmente el fenotipo de la segunda (lon) sin revertirla.

7. CONSTRUCCION DEL JUEGO ISOGENICO DEFICIENTE EN REPRESION CATABOLICA.

El juego isogénico deficiente en represión catabólica está constituido por las cepas mutadas en los genes cya y crp. Una herramienta empleada para la construcción de cepas es el bacteriófago P1, cm, c1R-100 (20). Este fago presenta las siguientes características: es de transducción generalizada; esto es, puede empaquetar

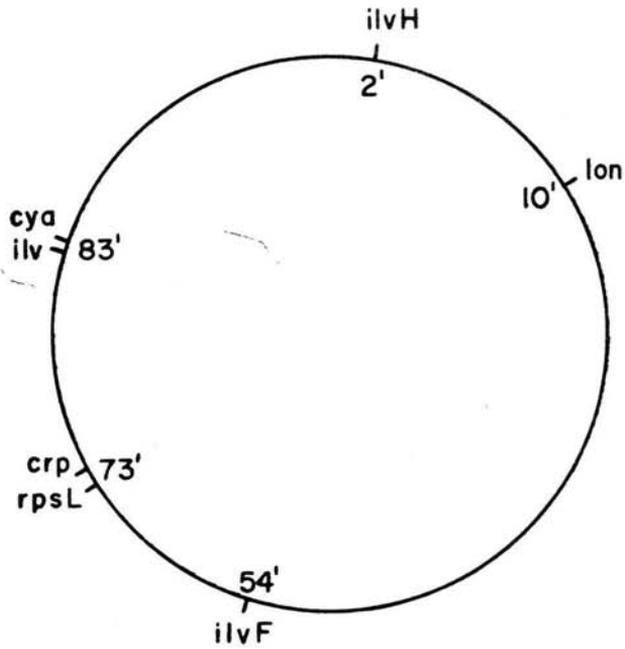


Figura 3. Mapa cromosómico de *E. coli* K-12. Localización de las mutaciones *cya*⁻, *crp*⁻, e *ilv*.

información del cromosoma bacteriano; es un fago temperado, con lo cual puede desarrollar ambas vías, la lítica y la lisogénica dependiendo de la temperatura en que se desarrolle; además presenta como marcador de selección la resistencia a cloranfenicol (Cm^R).

Es de gran ayuda la presencia de un marcador de fácil selección cercano a la mutación a transducir, en el caso del gene *crp*, localizado en el minuto 73 (2) del cromosoma, se encuentra muy cercano el gene *rpsL* que confiere resistencia a estreptomicina (5); el cual es un marcador excelente de selección. Para el gene *cya*, localizado en el minuto 83 (2), el marcador mas cercano y fácil de seleccionar es la resistencia a valina exógena (33) la cual puede estar conferida por tres regiones del cromosoma localizadas en los minutos 83 (34), 54 (33) y 2 (21), Figura 3.

Otra forma de seleccionar una mutante *cya* es mediante un truco genético utilizando el fago lambda (6); la estrategia es la siguiente: Para que una cepa presente el receptor al fago lambda requiere metabolizar la maltosa (35), si en una población bacteriana se encuentran presentes algunas células mutadas en *cya* y/o genes de utilización de la maltosa e infectamos con lambda virulento, solo sobrevivirán aquellas que no hayan presentado el receptor, ya sea por *cya*⁻, deficiencia en el metabo-

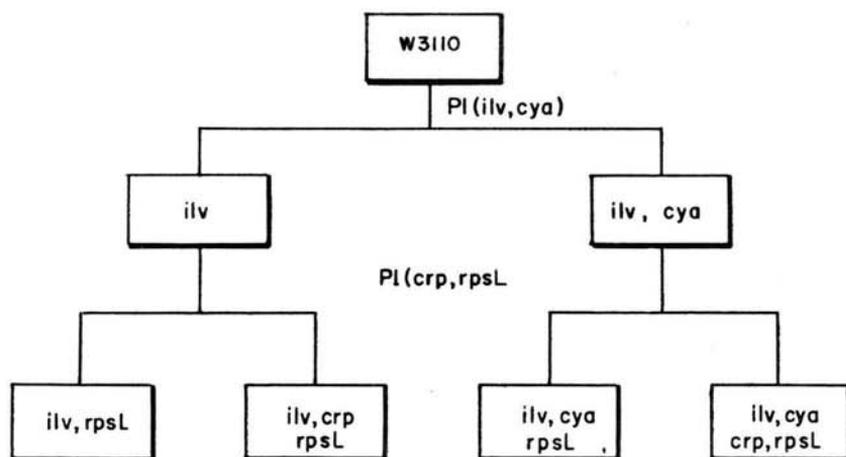


Figura 4. Construcción del juego isogénico deficiente en re-
presión catabólica de la cepa W 3110 de E. coli.
E. coli K- 12

lismo de la maltosa o resistencia al fago por algún otro mecanismo. Para diferenciar la mutante *cya* del resto de las candidatas se determina la habilidad de utilización de maltosa en presencia de AMPc.

8. ANTECEDENTES Y OBJETIVO.

El plásmido pYK007 con un peso molecular de 80,000 dal fue aislado de una cepa de E. coli de origen humano (42); este plásmido confiere resistencia a ampicilina y producción de enterotoxina termo-estable (ST), la cual está sujeta a represión catabólica (24). Es bien conocido que varios factores R portan la resistencia a ampicilina en un transposón (8), así también se ha reportado la presencia de la actividad enterotoxigénica (ST) localizada en un transposón, Tn 1681 (41) en el plásmido ESF 3001 de una cepa de E. coli de origen bovino.

Durante los estudios realizados en la síntesis de toxina (ST) y represión catabólica (24), Martínez y colaboradores, determinaron la pérdida de actividad toxigénica al ser transferido el pYK007 de una cepa sujeta a represión catabólica (*cya*-crp) hacia una silvestre. El porcentaje de transconjugantes $Ap^T ST^-$ varió de un 10 a un 50%. Esta pérdida podría deberse a: i) Que la resistencia a ampicilina y la producción de toxina estuvieran en dos plásmidos distintos y por lo tanto la transferencia fue-

se diferente; ii) Que la toxina ST se encuentre en un transposón el cual se pueda perder favorablemente por la ausencia del complejo AMPc-proteína receptora. El primer punto fue descartado al determinar los pesos moleculares de los fragmentos del plásmido tratado con la enzima de restricción Eco RI (24), correspondiendo la suma de éstos al PM del plásmido original. El segundo punto es el objetivo del presente trabajo: Determinar si el fenómeno de transposición está sujeto a represión catabólica.

9. ESTRATEGIA

El plásmido RP4 confiere resistencia a kanamicina, tetraciclina y ampicilina; esta última se encuentra en el transposón Tn1 (8). Este plásmido se introducirá por conjugación al grupo de cepas isogénicas deficientes en represión catabólica (cya, crp, cya-crp y silvestre), se seleccionará en forma independiente para cada antibiótico y se verificará la resistencia a los otros dos restantes para comprobar la integridad del plásmido. Posteriormente será transferido el plásmido de cada una de las cepas deficientes en represión catabólica hacia una cepa silvestre, la selección y comprobación del patrón de resistencia se realizará de la misma manera.

MATERIAL Y METODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de Escherichia coli K-12 empleadas se describen en la Tabla 1.

2. BACTERIOFAGO

Se empleó el bacteriófago P1 cml, c1r100, de transducción generalizada (20).

3. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Los medios de cultivo empleados fueron: Medio mínimo M9 Cornigie: NH_4Cl 1g, Na_2HPO_4 6g, NaCl 5g, agua 1 lt, se esteriliza y se agregan 10 ml de glucosa al 20% y 2 ml de MgSO_4 al 10% ya estériles por separado; cuando se requirió suplementación de aminoácidos y vitamina B1 se agregaron 10 ml de L-Thr al 1%, 10 ml L-Leu al 0.5%, 0.2 ml de B1 al 0.1%, 5 ml de L-His al 1%, 10 ml de L-Pro al 2%, 7 ml de DL-Met 1%. Medio Luria (L) (26) de la siguiente composición: Bacto-triptona 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g, 4.8 ml NaOH al 2%, agua 1 lt, cuando fue necesario suplementar con antibióticos se agregaron a 45°C al medio y esterilizado por filtración; 10 ml de Sm al 1%, 10 ml de Ac. Nal. al 0.5%, 10 ml de Ap, Km ó Tc al 0.25%, Medio Tetrazolio; Bacto extracto de buey 1.5g, extracto de levadura 3g, Bacto-peptona 6g, agua 950 ml, esterili-

TABLA 1
CEPAS BACTERIANAS DE Escherichia coli K-12

C E P A	FENOTIPO RELEVANTE	FUENTE
JK 8000	HfrH Sm ^r Thi ⁻	Este laboratorio
JK 8306	Hfr Sm ^r Thi ⁻ Cya ⁻	Este laboratorio
Jk 8307	HfrH Sm ^r Thi ⁻ Crp ⁻	Este laboratorio
Jk 8445	HfrH Sm ^r Thi ⁻ Cya ⁻ Crp ⁻	J. Beckwith
SA 500	F ⁻ Sm ^r His ⁻	J. Schrenk
JS.13.14	F ⁻ Sm ^r His ⁻ Lon ⁻	J. Schrenk
5080	F ⁻ Sm ^r His ⁻ Cya ⁻	J. Schrenk
5060	F ⁻ Sm ^r His ⁻ Crp ⁻	J. Schrenk
J53	RP4 Pro ⁻ Met ⁻ Ap ^r Km ^r Tc ^r	N. Datta
J54*	Pro ⁻ Met ⁻ Nal ^r	Este laboratorio
W3110	Thy ⁻	S. Willetts
CR34	Leu ⁻ Thr ⁻ Thy ⁻ Lac ⁻ Thy ⁻	Este laboratorio

* Cepa resultante de la curación del plásmido con naranja de Acridina de la cepa J53 (RP4).

zado el medio se agregaron 5 ml de cloruro 2, 3, 5, de tetrazolio 1% y 50 ml de maltosa al 20%. Medio Mac-Conkey Maltosa (Mac-D); MacConkey 40g, D-Maltosa 10g, agua 1 lt. Cuando fue necesario se espatuló 0.2 ml de AMPc 50 mM por caja. Agar R; Triptona 10g, extracto de levadura 1g, NaCl 8g, agar 7.5g, agua 1 lt, ya estéril se agregan 2 ml de CaCl_2 1M y 1 ml de glucosa al 20%. Solución de dilución salina; NaCl al 0.85%. Solución amortiguadora MC; 0.05ml de CaCl_2 1 M, 1 ml de MgSO_4 1M, agua 9ml. Para solidificar los medios de cultivo se empleó agar al 1.5%.

4. CONJUGACIONES

Los cultivos bacterianos de la cepa donadora y receptora fueron crecidos en 5 ml de medio L a 37°C durante la noche para ser diluidos 1:40 en el mismo medio y crecidos hasta una densidad óptica de 100 UK con filtro verde (5×10^8 bac/ml) a 37°C y con agitación. Posteriormente fueron mezclados en relación de 1:10 (donadora:receptora). Se incubó la mezcla sin agitación a 37°C; se tomaron alícuotas a 0, 0.5, 1, 2, 3 y 20 horas, éstas se diluyeron en solución salina al 0.85% de NaCl y se sembraron diluciones apropiadas en los diferentes medios selectivos. La selección se llevó a cabo por separado para cada par de antibióticos en medio L suplementado con Sm-Ap, Sm-Km, Sm-Tc, Nal-Ap, Nal-Km y Nal-Tc.

5. MINIMETODO PARA DETERMINACION DE PLASMIDOS.

3 ml de cultivo crecido en fase logarítmica en medio L fueron lavadas las células dos veces con 3 ml de TES (tris 50 mM, NaCl 50mM, EDTA-Na₂ 5 mM pH 8) resuspendidas en 120 µl de sacarosa al 25% disuelta en tris 50 mM pH 8) e incubadas 5' en baño de hielo; se añadieron 24µl de lisozima (5 mg/ml en tris 50 mM pH 8) y se incubó por 5', posteriormente se agregaron 48µl de 0.25 M de EDTA-Na₂ pH 8 incubándose 5'; finalmente se adicionaron 60µl de mezcla lítica de Boyer (Tritón X-100 0.3%, EDTA-Na₂ 187 mM, tris 150 mM pH 8) e incubándose por 15'. Se agregaron 48 µl NaCl 5 M y se invirtió el tubo. Después se añadieron 120 µl de agua destilada estéril y 84 µl de pronasa (5 mg/ml en TES preincubada a 37°C por 15') incubándose durante 15' a 37°C; 500 µl de fenol destilado y saturado con TES a 37°C, 250 µl de cloroformo se adicionaron invirtiéndose la muestra por 15' y centrifugándose por 5' en una centrífuga Eppendorf modelo 5414 recuperando la fase acuosa a la cual se le agregó 1 ml de éter saturado con TES, se invirtió 2' y se descartó la fase superior (se repitió este último paso). La fase inferior se ajustó con 5 M de NaOH a pH 12, incubándose a 37°C por 30' para neutralizar a pH 7.7 y colocarlo en baño de hielo. Se agregaron 0.5 g de nitrocelulosa y el tubo se invirtió por 15', se centrifugó por

3' y al sobrenadante se agregaron 50 μ l de acetato de sodio 3 M pH 6 y 1 ml de etanol absoluto a -20°C por 18 hrs. Se centrifugó 15' en la centrífuga Eppendorf y la pastilla se resuspendió en 200 μ l de acetona; se centrifugó 3' y se secó al aire. Se resuspendió la pastilla en 50 μ l de TES diluído 10 veces (0.1 X) incubándose 10' a 37°C .

6. ELECTROFORESIS

A cada muestra de 50 μ l se añadió 10 μ l de azul de bromo fenol (0.07% de azul de bromofenol, 33% glicerol y 7% SDS) y se aplicó a los pozos de un gel vertical en placa de agarosa al 0.7% con solución amortiguadora de tris-Boratos (tris 89 mM, EDTA- Na_2 2.5 mM, ácido bórico 89 mM). La electroforesis fue a 125 volts por espacio de 3 hrs. El gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.4% por 15' y se lavó en agua corriente por 30'. Para la fotografía del gel se empleó un filtro amarillo y una cámara polaroid Land MP 4 y película polaroid tipo 55 con un transiluminador de luz ultravioleta.

7. PRUEBA PARA REVERSION A Km^{r} Y Tc^{r} EN LAS CEPAS J54 Ap^{r} , Km^{s} Y Tc^{s} .

El cultivo de la cepa en prueba fue crecido hasta fase logarítmica en medio L, lavado y resuspendido en la mitad de su volumen original en solución salina para espatular 0.1 ml en cajas de medio L suplementado con Nal-Km y Nal-Tc,

incubando a 37°C por 36 hrs.

8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (mic)

Se empleó la técnica por dilución en placa (11). Utilizando un sembrador múltiple tipo Steers se agregó 0.5 ml de los cultivos crecidos en fase logarítmica para cada uno de los pozos del sembrador (este sembrador transfiere un volumen constante de células) la siembra se efectuó en cada una de las cajas de L suplementada con una concentración inicial máxima de 7.8 mg/ml de Ap, esta concentración fue diluída al 50% en cada paso siguiente hasta llegar a 15 µg/ml, las cajas fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

9. SOBREVIDA A RADIACION CON LUZ UV.

Un cultivo de 5 ml crecido durante la noche se lavó y se resuspendió en el mismo volumen de 0.1 M de MgSO₄. La radiación se efectuó con una lámpara mercurial General Electric precalentada por 30' (la intensidad de la radiación emitida por la lámpara fue determinada con un fotómetro germicida 1L254 International light). Las células fueron transferidas a una caja de Petri estándar agitándolas con una barra magnética, tomando alícuotas a diferentes tiempos y sembrando diluciones apropiadas en cajas de medio L, incubando por 48 hrs a 37°C. Para evitar la fotoreparación del DNA (47) las células se

mantuvieron en la obscuridad a partir del momento en que fueron radiadas hasta ya transcurridas las 48 hrs de incubación.

10. FILAMENTACION CELULAR

La filamentación celular se determinó por microscopía de contraste de fases de los cultivos desarrollados en medio líquido M9 a 25°C y con baja agitación (19).

11. DETECCION DE PLASMIDOS EN GRADIENTES ISOPICNICOS DE CsCl Y BROMURO DE ETIDIO.

Para detectar la presencia de plásmido (s) críptico (s) en la cepa W 3110 se empleó el método descrito por Bazarl y Hellinski (3): Un cultivo de 10 ml crecido en medio M9 fue marcado previamente con 10 μ Ci/ml de 3 H-Thy y sometido de la siguiente manera manteniendo la temperatura a 4°C. Se lavó dos veces en TES, las células se resuspendieron en 1 ml de mezcla lítica (1 mg de lisozima, 0.5 mg de RNasa A, 100 mg sacarosa/ml de TES), se incubó 10' a 37°C y luego 5' en hielo, se agregó 0.5 ml de sarkosyl al 2% y fue homogenizado por repipeteo, se adicionó 1 ml de TES y se repitió la homogenización, se transfirió el lisado (+ 2.5 ml) a un tubo de centrífuga del rotor 50 de titanio marca Beckman, se agregó 13.1g de CsCl, 7.6 ml de TES y 0.64 ml de bromuro de etidio (5mg/ml

en agua). La mezcla se centrifugó a 45,000 rpm por 36 hrs en una ultracentrífuga Beckman modelo L8-55. Ya formado el gradiente se perforó el tubo por la parte inferior y se realizó la colecta de 10 gotas en papel filtro de fibra de vidrio de 4 cm^2 , se secaron los papeles con calor seco y se lavaron cuatro veces en TCA (ácido tricloroacético) al 10%, 2 veces con etanol al 95% y un último paso con éter por 5' a medio ambiente; los lavados anteriores se realizan a 4°C . Después de haber secado los filtros se introdujeron a un vial con 8 ml de líquido de centelleo tolueno-POPOP-PPO (0.4 g 1, 4,-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzeno; 12.5 g 2.5-diphenyloxazole/ 2.5 lts de tolueno); cada vial fue contado en un contador de centelleo Packard modelo 3385.

12. LISOGENIZACION CON P1 Cm, c1R-100 E INDUCCION DE PARTICULAS TRANSDUCTANTES.

La cepa candidata fue crecida en 5 ml de medio L suplementado con CaCl_2 5 mM y MgSO_4 10 mM hasta 50 U. K. (filtro verde), se realizó la infección sin agitación a una moi de 0.1 y 0.01; se incubó 20' a 32°C y se estrió una asada en medio sólido de L suplementado con $12 \mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol, esta resistencia es conferida por la lisogenización del bacteriófago, se incubó a 32°C por 18 hrs, se purificaron diez candidatas en el

mismo medio por duplicado incubando una de ellas a 40°C; en esta última temperatura las células mueren al ser lisadas por el fago, ya que éste posee una mutación temperatura sensible en el represor de las funciones líticas.

Una de las diez candidatas fue crecida en medio L suplementado con cloranfenicol a 32°C; se diluyó el cultivo crecido durante la noche a 1:1000 en 5 ml de L y fue crecido hasta 50 U. K. (filtro verde) a 32°C; se indujo la lisis a 40°C durante 35' y luego se cambió a 37°C por el espacio de una hora o hasta lisis; se agregaron cinco gotas de cloroformo y se agitó por 20'; se centrifugó a 3,000 xg por 10'. El sobrenadante se tituló sobre la bacteria sensible al fago en cajas de agar R.

13. TRANSDUCCION DE crp

Un cultivo de 5 ml de la cepa a transducir fue crecido a 37°C en medio líquido L durante la noche, posteriormente se centrifugó 3,000 xg, 5' y la pastilla fue resuspendida en el mismo volumen de solución amortiguadora MC (MgSO_4 0.01 M y CaCl_2 5 mM); se aerearon a 37°C por 15'; se agregó un volumen de 0.1 ml de células en cinco tubos de vidrio estériles, con capacidad de 5 ml y 0.1 ml de lisado del bacteriófago propagado en la cepa JK8307 en diluciones de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} (una dilución en cada tubo) con controles de bacteria y lisado por separado; se ad-

sorbió a 32°C por 20', se agregó 0.2 ml de citrato de sodio 1 M a cada tubo; se agregaron 3 ml de medio L y se incubaron a 32°C con agitación por 4 hrs; se centrifugaron las muestras a 12,000 xg por 10', las células fueron resuspendidas en 0.2 ml de citrato de sodio 1 M y 2.5 ml de medio L-suave para ser vertido en cajas de L suplementado con 100 µg/ml de Sm, se incubaron por 36 hrs a 37°C. Mediante la técnica de picadura con palillo se transfirieron 200 colonias en medio de Mac-Conkey maltosa con y sin 10 µM AMPc/caja, la fermentación del carbohidrato da coloración roja.

14. TRANSDUCCION DE cya.

Para transducir cya se emplearon básicamente dos metodologías: i) utilizando como marcador de selección la resistencia a valina exógena (34) y ii) enriquecimiento poblacional de mutantes Mal⁻ con ampicilina (37) y con el bacteriófago lambda (35); distinguiendo a las candidatas cya⁻ de mal⁻ por su habilidad de fermentar el carbohidrato en presencia de AMP_c (6, 32). Fueron desarrolladas de la siguiente manera:

La transducción se realizó a diferentes moi de infección (10, 100 y 1000) con el fago P1 propagado en la cepa JK8306 (cya⁻), fueron crecidas las células en 10 ml de medio M9 a 37°C en ausencia de maltosa a una densidad de

2×10^8 cel/ml, se agregó ampicilina a una concentración final de 50 μ g/ml por 1-2 hrs (la ampicilina actúa en la síntesis de pared celular de aquellas células que se encuentran en división), se lavaron las células con medio fresco y sin ampicilina, se crecieron diluciones apropiadas en medio de Mac-Conkey-Maltosa. En este medio la clona que utiliza la maltosa presenta una coloración roja y la que no lo usa da coloración blanca. Las candidatas blancas se crecieron en presencia de AMPc para determinar el fenotipo cya^- .

En el segundo caso de enriquecimiento se empleó el fago lambda, con la siguiente metodología: ya realizada la transducción se creció el cultivo en medio mínimo M9 con maltosa como única fuente de carbono durante toda la noche, se diluyó el cultivo 1:25 en el mismo medio y se creció a una densidad de 2×10^8 cel/ml a 32°C, se diluyó 10 veces y se infectó 0.1 ml de células con 0.1 ml de lambda virulento a una moi de 10,000, se incubó a 37°C por 20' sin agitación, la identificación se efectuó en medio de tetrazolio a 37°C por 24-36 hrs de incubación, en este medio la clona que utiliza el carbohidrato da una coloración blanca y la que no lo usa da coloración roja, posteriormente las candidatas rojas fueron crecidas en el mismo medio en presencia de AMPc para determinar su fenotipo cya .

RESULTADOS1. TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO RP4 A LAS CEPAS DEFICIENTES EN REPRESION CATABOLICA Y lon.

Las tablas 2 y 3 muestran las frecuencias de transferencia del plásmido de la cepa J53 (RP4) hacia las cepas HfrH y F⁻, respectivamente. Las frecuencias están calculadas por donadora y por receptora a los 60' de conjugación. Como podemos observar, la relación donadora: receptora no se mantiene constante en todos los casos, principalmente en la cepa lon⁻ debido a la filamentación celular producida por esta mutación (Fig. 6). En la mayoría de los casos podemos observar que existe una frecuencia mayor al seleccionar para la resistencia a Ap y una menor para Tc.

De cada una de las ocho cruzas se aisló y purificó una colonia transconjugante tomada al azar para ser utilizada como donadora del plásmido.

2. TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO RP4 A LA CEPA J54.

Las Tablas 4 y 5 muestran las frecuencias de transferencia del plásmido RP4 de las cepas deficientes en represión catabólica y lon hacia la cepa J54. Estas frecuencias están calculadas por donadora y receptora a las 20 hrs de conjugación a excepción de la cruz a la cepa

TABLA 2

FRECUENCIAS DE TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO RP4 A LAS CEPAS HfrH

CEPA RECEPTORA	FENOTIPO RELEVANTE	RECUENCIA/DONADORA $\times 10^{-4}$			FRECUENCIA/RECEPTORA $\times 10^{-4}$			*RELACION DONADORA: RECEPTORA
		Sm-Ap	Sm-Km	Sm-Tc	Sm-Ap	Sm-Km	Sm-Tc	
JK8000	Sm ^r Cya ⁺ Crp ⁺	10	1.0	2.2	45	4.5	9.5	1:2
JK8306	Sm ^r Cya ⁻	8.6	6.0	0.3	8.6	6.0	0.3	1:10
JK8307	Sm ^r Crp ⁻	1.0	1.5	0.1 ^b	3.5	5.3	0.3	1:2
CA8445	Sm ^r Cya ⁻ Crp ⁻	40	15	4.5	30	11	3.4	1:14

Las conjugaciones se efectuaron según material y métodos, sembrándose por separado en los siguientes medios selectivos: Sm-Ap, Sm-Km, Sm-Tc. Las frecuencias fueron calculadas a los 60' de conjugación. La cepa donadora en todos los casos fue la J53 (RP4).

* Por cuenta viable.

TABLA 3

FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO RP4 A LAS CEPAS F⁻

CEPA RECEPTORA	FENOTIPO RELEVANTE	FRECUENCIA/DONADORA X 10 ⁻⁴			FRECUENCIA/RECEPTORA X 10 ⁻⁴			*RELACION DONADORA: RECEPTORA
		Sm-Ap	Sm-Km	Sm-Tc	Sm-Ap	Sm-Km	Sm-Tc	
SA500	Sm ^r Lon ⁺	6.8	3.8	0.2	3.6	2.0	0.1	1:19
JS.13.14	Sm ^r Lon ⁻	0.6	0.4	0.9	14	10	20	1:0.4
5080	Sm ^r Lon ⁺ Cya ⁻	2.8	0.4	0.8	5.9	0.8	1.5	1:4
5060	Sm ^r Lon ⁻ Crp ⁻	14	10	0.3	18	12	0.4	1:7

Las conjugaciones se efectuaron según material y métodos, sembrándose por separado en los siguientes medios selectivos: Sm-Ap, Sm-Km, Sm-Tc. Las frecuencias fueron calculadas a los 60' de conjugación. La cepa donadora en todos los casos fue la J53 (RP4).

* Por cuenta viable.

TABLA 4

FRECUENCIAS DE TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO RP4 DE LAS CEPAS HfrH
HACIA LA CEPA J54 COMO RECEPTORA

CEPA DONADORA	FENOTIPO RELEVANTE	FRECUENCIA/DONADORA X 10 ⁻⁴			FRECUENCIA/RECEPTORA X 10 ⁻⁴			*RELACION DONADORA: RECEPTORA
		Nal-Ap	Nal-Km	Nal-Tc	Nal-Ap	Nal-Km	Nal-Tc	
JK8000	Sm ^r Cya ⁺ Crp ⁺	2.2	2.1	1.5	1.2	1.2	0.9	1:17
JK8306	Sm ^r Cya ⁻	7.8	2.7	0.5	5.5	1.9	0.4	1:14
JK8307	Sm ^r Crp ⁻	0.1	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	1:27
CA8445	Sm ^r Cya ⁻ Crp ⁻	10	1.7	1.4	13	2.2	1.8	1:7

27

Las conjugaciones se efectuaron según material y métodos, sembrándose por separado en los siguientes medios selectivos: Nal-Ap, Nal-Km y Tal-Tc. Las frecuencias fueron calculadas a las 20 hrs. de conjugación en todos los casos.

* Por cuenta viable.

TABLA 5

FRECUENCIAS DE TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO RP4 DE LAS CEPAS F⁻
HACIA LA CEPA J54 COMO RECEPTORA

CEPA DONADORA	FENOTIPO RELEVANTE	FRECUENCIA/DONADORA X 10 ⁻⁴			FRECUENCIA RECEPTORA X 10 ⁻⁴			*RELACION DONADORA: RECEPTORA
		Nal-Ap	Nal-Km	Nal-Tc	Nal-Ap	Nal-Km	Nal-Tc	
SA500	Sm ^r Lon ⁺	0.4	0.04	0.1	0.5	0.05	0.1	1:7
JS.13.14	Sm ^r Lon ⁻	0.4	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	1:120
5080	Sm ^r Lon ⁺ Cya ⁻	23	20	18	14	12	11	1:18
5060	Sm ^r Lon ⁻ Crp ⁻	0.7	0.3	0.3	0.8	0.4	0.3	1:9

Las conjugaciones se desarrollaron según material y métodos, sembrándose por separado en los siguientes medios selectivos: Nal-Ap, Nal-Km y Nal-Tc. Las frecuencias fueron calculadas a las 20 hrs de conjugación en todos los casos a excepción de la cruce entre la cepa SA500 (RP4) y la cepa J54 que se realizó a los 60' de conjugación.

* Por cuenta viable

SA500 (RP4) ya que fue posible obtener transconjugantes a los 60'. Nuevamente observamos la gran variabilidad de la relación donadora:receptora que debiera mantenerse de 1:10; posiblemente se deba a muerte celular del cultivo, ya que la medición se realizó por cuenta viable en cajas de medio L sólido. Las frecuencias se encuentran disminuídas en los tres medios selectivos; esta disminución nos indica que los juegos isogénicos sujetos a represión catabólica y lon⁻ son mas susceptibles de recibir el plásmido que de transferirlo. Además, en ambas cruzas se observa una frecuencia mayor al realizar la selección con Ap, este fenómeno fue detectado por otros autores (12) en donde encuentran hasta dos órdenes de magnitud mayor comparada con la selección en Km.

3. DISOCIACION DEL PATRON DE LIGAMIENTO A LA RESISTENCIA DEL PLASMIDO RP4.

Para determinar si el patrón de resistencia a Ap, Km y Tc continuaba íntegro en la transferencia del plásmido (ya que la selección se efectuó por separado) se verificó por la técnica de picadura con palillo en placa, la resistencia los otros dos antibióticos, ejem. las transconjugantes crecidas en Ap se probaron para Km y Tc.

El patrón de resistencia conferido por el plásmido RP4

TABLA 6
PATRON DE LIGAMIENTO A LA RESISTENCIA DE LAS TRANS-
CONJUGANTES HfrH RESULTANTES DE LA CRUZA CON LA CE-
PA J53 (RP4)

CEPA RECEPTORA	FENOTIPO RELEVANTE	S E L E C C I O N							
		Sm-Ap				Sm-Tc ó Sm-Km			
		GRUPOS DE SEGREGACION %				GRUPOS DE SEGREGACION %			
Ap	Km	Tc	Ap	Ap	Km	Tc	Ap		
JK8000	Cya ⁺ Crp ⁺	100	-	-	100	-	-	-	
JK8306	Cya ⁻	100	-	-	100	-	-	-	
JK8307	Crp ⁻	100	-	-	100	-	-	-	
CA8445	Cya ⁻ Crp ⁻	100	-	-	100	-	-	-	

La determinación del patrón de ligamiento a la resistencia a ampicilina, kanamicina y tetraciclina es descrita en material y métodos.

TABLA 7
PATRON DE LIGAMIENTO A LA RESISTENCIA DE LAS
TRANSCONJUGANTES F⁻ RESULTANTES DE LA CRUZA
CON LA CEPA J53 (RP4).

CEPA RECEPTORA	FENOTIPO RELEVANTE	S E L E C C I O N			
		<u>Sm-Ap</u>		<u>Sm-Tc ó Sm-Km</u>	
		GRUPOS DE SEGREGACION %		GRUPOS DE SEGREGACION %	
		Ap	Km Tc	Ap	Ap Km Tc Ap
SA500	Lon ⁺		100	-	100 -
JS.13.14	Lon ⁻		100	-	100 -
5080	Lon ⁺ Cya ⁻		100	-	100 -
5060	Lon ⁻ Crp ⁻		100	-	100 -

La determinación del patrón de ligamiento a la resistencia a ampicilina, kanamicina y tetraciclina es descrita en material y métodos.

TABLA 8

PATRON DE LIGAMIENTO A LA RESISTENCIA DE LAS
TRANSCONJUGANTES J54 RESULTANTES DE LAS CRU-
ZAS CON LAS CEPAS HfrH (RP4) COMO DONADORAS

CEPA RECEPTORA	FENOTIPO RELEVANTE	S E L E C C I O N							
		Nal-Ap				Nal-Km ó Nal-Tc			
		GRUPOS DE SEGREGACION %				GRUPOS DE SEGREGACION %			
Ap	Km	Tc	Ap	Ap	Km	Tc	Ap		
JK8000	Cya ⁺ , Cr ⁺	100	-	-	100	-	-	-	
JK8307	Crp ⁻	45	55	-	100	-	-	-	
JK8445	Cya ⁻ , Crp ⁻	32	68	-	100	-	-	-	

La determinación del patrón de ligamiento a la resistencia a ampicilina, kanamicina y tetraciclina es descrita en material y métodos.

TABLA 9
PATRON DE LIGAMIENTO A LA RESISTENCIA DE LAS
TRANSCONJUGANTES J54 RESULTANTES DE LAS CRU-
ZAS CON LAS CEPAS F⁻ (RP4) COMO DONADORAS

CEPA RECEPTORA	FENOTIPO RELEVANTE	S E L E C C I O N					
		Nal-Ap			Nal-Km ó Nal-Tc		
		GRUPOS DE SEGREGACION %		%	GRUPOS DE SEGREGACION %		%
Ap	Km	Tc	Ap		Km	Tc	
SA500	Lon ⁺	100	-	-	100	-	-
JS.13.14	Lon ⁻	37	63	-	100	-	-
5080	Lon ⁺ Cya ⁻	100	-	-	100	-	-
5060	Lon ⁻ Crp ⁻	54	46	-	100	-	-

La determinación del patrón de ligamiento a la resistencia a ampicilina, kanamicina y tetraciclina es descrita en material y métodos.

TABLA 10

PATRON DE LIGAMIENTO A LA RESISTENCIA DE LAS
TRANSCONJUGANTES J54 RESULTANTES DE LAS CRU-
ZAS CON LA CEPA JK8306 (RP4) cya⁻ COMO DONA-
DORA EN PRESENCIA (*) Y AUSENCIA (**) DE AMPc

CEPA DONADORA	FENOTIPO RELEVANTE	S E L E C C I O N							
		<u>Nal-Ap</u> GRUPOS DE SEGREGACION %			<u>Nal-Km ó Nal-Tc</u> GRUPOS DE SEGREGACION %				
		Ap	Km	Tc	Ap	Ap	Km	Tc	Ap
JK8306**	Cya ⁻		55		45		100		-
JK8306*	Cya ⁻		1		99		100		-

La presencia de AMPc en el medio de conjugación revierte el fenotipo Cya⁻, con lo cual la cepa se debiera comportar como la silvestre.

de las transconjugantes Hfr y F⁻ seleccionadas en los distintos medios se mantuvo íntegro (Tablas 6 y 7), es to es, presentaron resistencia a Ap, Km y Tc independientemente del medio en que fueron seleccionadas. Al ser transferido el plásmido a partir de las cepas sujetas a represión catabólica y lon⁻, se generó un grupo de cepas resistentes únicamente a Ap (con excepción de la cepa 5080 cya) interpretándose como la transposición (Tablas 8, 9 y 10). En el caso particular de la cruz JK 8306 Hfr cya vs J54 en presencia de AMPc (Tabla 10) se determinó un aumento del 99% de transconjugantes que habían perdido la resistencia a Km y Tc, en este ensayo lo esperado sería idéntico que la cepa silvestre, ya que el AMPc revierte el fenotipo cya (6, 32); esto sugiere fuertemente que la represión catabólica (en particular la cepa 5080 cya) no interactúa con la transposición, quedando dos posibles alternativas: la posible mutación lon presente en la cepa Hfr cya (por comunicación personal de J. Schrenk) o la mutación crp.

4. PRESENCIA DE UN PLASMIDO DE MAYOR PESO MOLECULAR QUE EL RP4 EN LAS TRANSCONJUGANTES J54 Ap^r, Km^s, Ts^s.

Para analizar el problema de disociación a nivel molecular se empleó el minimétodo para aislamiento de plásmidos desarrollado en este laboratorio. La Figura 5 muestra

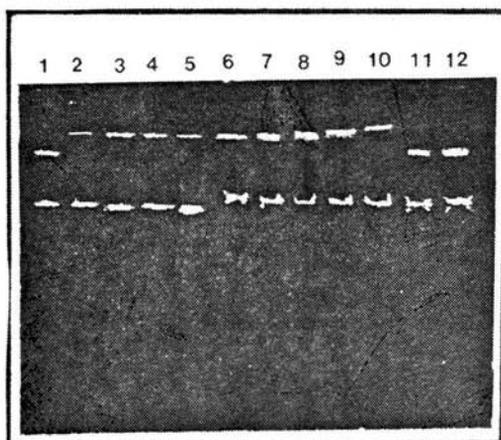


Figura 5. Análisis del contenido de plásmidos presentes en las transconjugantes J54 seleccionadas en ampici-
lina y que perdieron la resistencia a Km y Tc; es-
tas cepas provienen de la cruce con la cepa JK8445
(RP4). Carril 1) J54(RP4) Ap^R Km^R Tc^R carriles 2 al 10)
candidatas J54 Ap^R Km^S Tc^S, carril 11) J53 (RP4),
carril 12) JS.13.14 (RP4) Lon⁻. La banda común a
todos los carriles corresponde al DNA cromosomal.

los resultados, en el carril 10. se muestra el DNA aislado de la cepa J54 Ap^R, Km^R, Tc^R, (resultante de la conjugación con la cepa CA8445 (RP4), del carril 20. al 100. son 9 clonas J54 Ap^R resultantes de la misma conjugación, en el carril 11 la muestra de la cepa J53 (RP4) y en el carril 120. la cepa JS 13.14 (RP4) lon⁻. Como puede notarse, las transconjugantes J54 Ap^R presentan una banda de mayor P M que el RP4.

Esto podría sugerir que el Tn1 había sido incrementado en número de copias impidiendo así la expresión de los genes de resistencia a Km y Tc; para comprobar lo anterior se emplearon dos criterios:

- a) Determinación de la concentración inhibitoria mínima en las transconjugantes J54 Ap^R, Km^S Tc^S. Normark y colaboradores (28) encontraron una relación directa entre el número de copias del gene productor de la enzima beta-lactamasa y la concentración del antibiótico al cual era resistente. Si el Tn1 se encontrara aumentado en número de copias se podría esperar que aumentara la concentración de beta-lactamasa y por consiguiente una concentración inhibitoria mayor. La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos, de donde podemos señalar que el grupo de cepas Ap^R presentaron una CIM menor (2.5 a 1.9 mg/ml) que el grupo de resistencia a los tres antibióticos (mayor de 5.1 mg/ml).

TABLA 11
CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA PARA AMPICILINA
DE LAS TRANSCONJUGANTES J54 RESULTANTES DE LAS
CRUZAS CON LAS CEPAS DEFICIENTES EN REPRESION CA-
TABOLICA Y Lon⁻

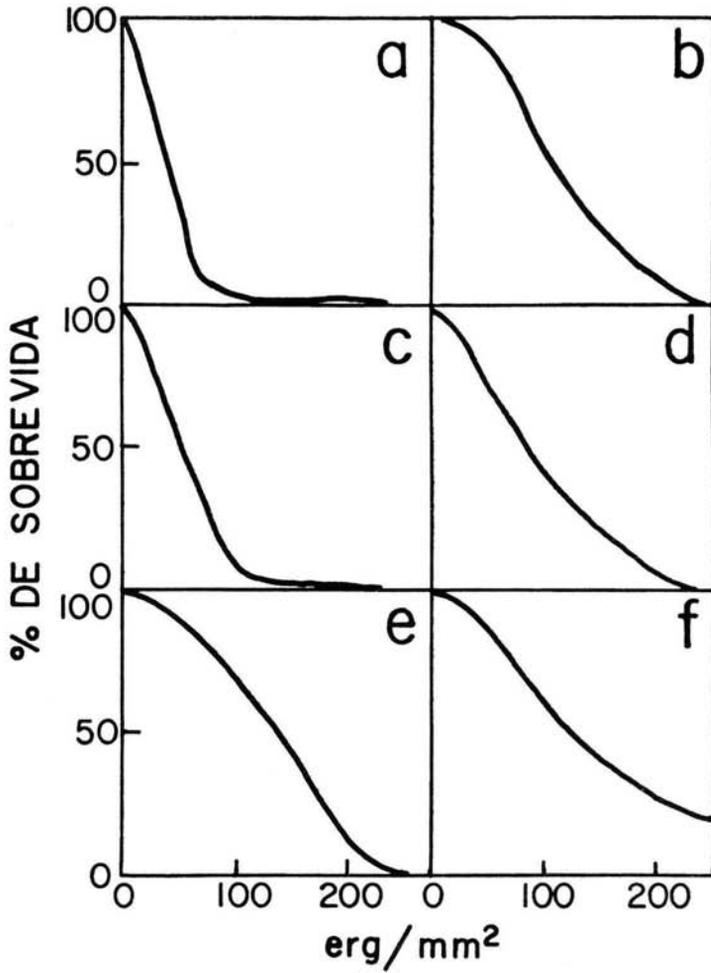
ORIGEN DE LA CRUZA	FENOTIPO Ap ^r Km ^r Tc ^r	Ap ^r	(mg/ml)
JK8306 Cya ⁻	5.12	2.56	
JK8445 Cya ⁻ Crip ⁻	5.12	2.56	
JS.13.14 Lon ⁻	5.12	1.95	
5060 Crp ⁻ Lon ⁻	5.12	1.95	

b) Determinación de la reversión a la resistencia para Km y Tc. Otro criterio para determinar si el aumento del Tn1 impedía la expresión para la resistencia a Km y Tc, fue determinar la frecuencia con que re-vertieran la resistencia a Km y Tc. Esta prueba resultó negativa en todos los casos.

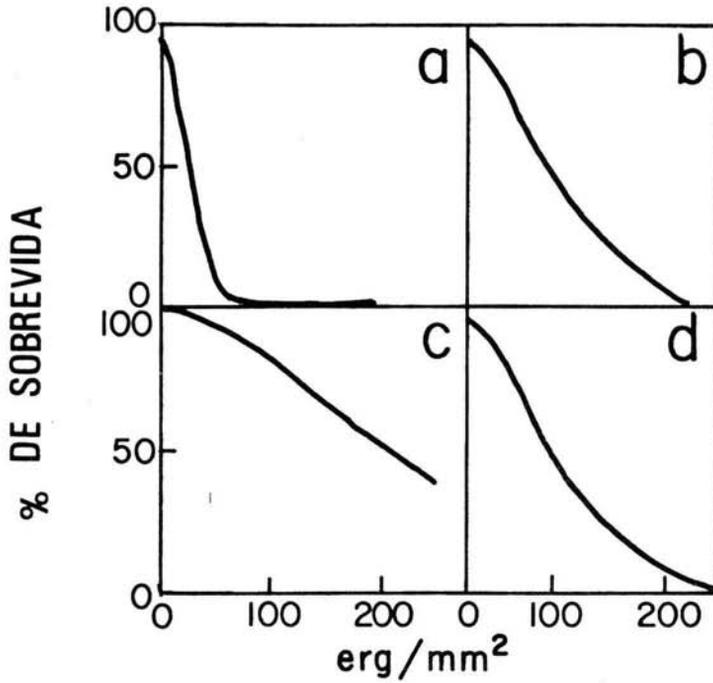
Hasta ese momento los resultados eran muy confusos y la única alternativa que justificara la disociación era la mutación lon, la cual podría estar presente en las cepas crp; tomando en cuenta este hecho, decidimos probar el fenotipo lon en las cepas Hfr, tomando tres criterios ya descritos en la literatura: a) sensibilidad a luz ultravioleta (1), b) filamentación celular (19) y c) mucosidad colonial (9).

5. DETERMINACION DE LA MUTACION lon EN EL GRUPO DE CEPAS Hfr

- a) Sensibilidad a luz ultravioleta. Las gráficas 1 y 2 muestran las curvas de sobrevivencia a luz ultravioleta, puede notarse que la cepa JK8000 fue la única que presentó sensibilidad; en cambio la cepa 5060 crp⁻, lon⁻ (control) no mostró sensibilidad.
- b) Filamentación celular. La figura 6 muestra los resultados de esta prueba, como puede notarse, la única cepa que forma filamentos es la JS.13.14 lon⁻ y no así la 5060 crp⁻, lon⁻ (control).



Gráfica 1. Sobrevida a la radiación por rayos ultravioleta para determinar el fenotipo Lon⁻. a) JS.13.14 lon⁻, b) SA500 lon⁺, c) JK8000 Hfr, d) JK8306 cya⁻, e) JK8307 crp⁻, f) JK8445 cya⁻, crp⁻.



Gráfica 2. Sobrevida a la radiación por rayos ultravioleta para determinar el fenotipo lon⁻. a) JS.13.14 lon⁻. b) SA500 lon⁺, c) 5080 cya⁻, d) 5060 crp⁻.

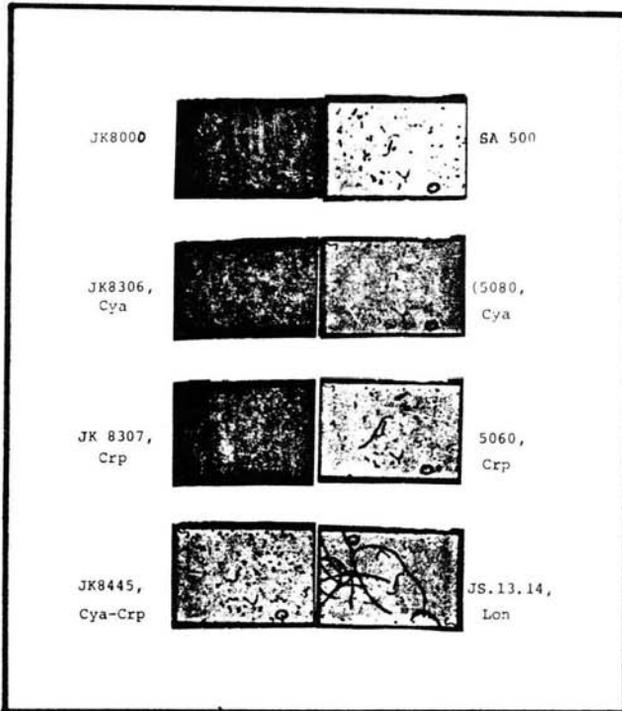
JUEGO ISOGENICO

Figura 6. Fotomicrografías de células de *E. coli*, para determinar la filamentación celular debida a la mutación lon. 600X.

Estos resultados nos sugieren que la cepa JK8000 presenta la mutación lon o alguna otra mutación críptica que le confiere este fenotipo (por ejemplo uvr). El Dr. Jergen Schrenk nos informó que al construir una cepa crp invariablemente se presentaba la mutación lon, cuyo fenotipo es enmascarado por la primera mutación, esto hace pensar que la mutación lon esté presente en la cepa JK8000 y su fenotipo no se detecte en la cepa JK8306 crp por la presencia de crp (Figura 7).

6. PRESENCIA DE PLASMIDOS CRIPTICOS EN LAS CEPAS QUE DETECTARON DISOCIACION DEL PATRON DE RESISTENCIA.

Estudios realizados en el laboratorio por Luz Ma. Guzmán demostraron la presencia de un plásmido críptico en la cepa JK8000 Hfr, esto es, un plásmido del cual no se conoce su función. Ya que la cepa JK8307 crp proviene de una transducción de crp con la cepa JK8000, es de esperarse que también presente el plásmido críptico. En la figura 7 se indica la construcción del juego isogénico deficiente en represión catabólica Hfr.

Utilizando el minimétodo para aislamiento de plásmidos pudimos detectar un plásmido críptico en todas aquellas cepas HfrH y F⁻ que habían mostrado disociación al patrón de resistencia, los resultados son mostrados en la Figura 8; aparentemente todos los plásmidos son de ma-

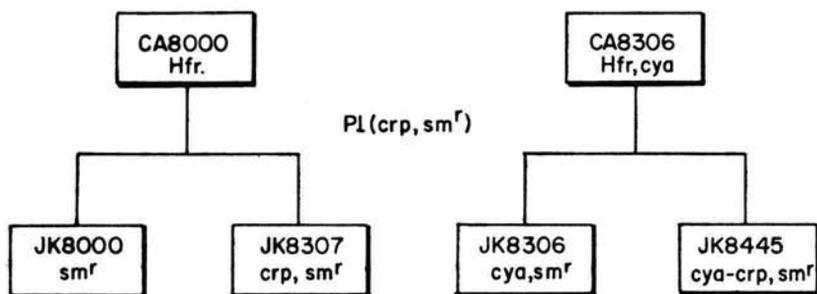


Figura 7. Construcción del juego isogénico deficiente en represión catabólica del grupo Hfr.

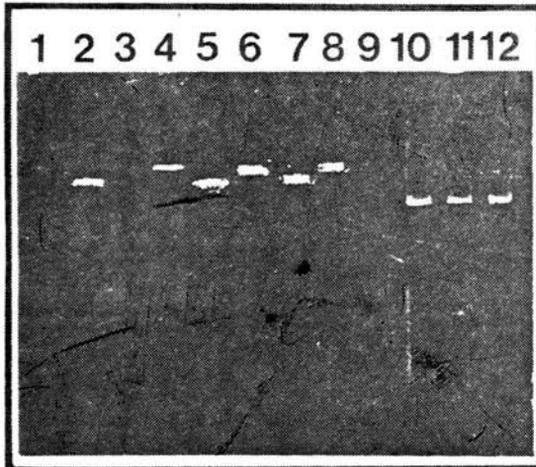


Figura 8. Análisis del contenido de plásmidos presentes en las cepas deficientes en represión catabólica y Lon^- . Carriles: 1) SA500, 2) JS.13.14 Lon^- , 3) 5080 Cya^- , 4) 5060 $\text{Lon}^- \text{Crp}^-$, 5) JK8000, 6) JK8306 Cya^- , 7) JK8307 Crp^- , 8) JK8445 $\text{Cya}^- \text{Crp}^-$, 9) J54, 10) J54 (RP4).

por peso molecular que el RP4.

7. CONSTRUCCION DEL JUEGO ISOGENICO DEFICIENTE EN REPRESION CATABOLICA LIBRE DE PLASMIDO CRIPTICO.

La presencia de un plásmido críptico en aquellas cepas en que se presentó la disociación del plásmido RP4 (transposición) abre otra posibilidad para explicar el motivo de la disociación.

Esta situación nos obligó a construir un juego isogénico deficiente en represión catabólica libre de plásmido críptico. Se escogió como candidata para la construcción del juego la cepa de E. coli K-12 W3110.

Empleando el método de Bazaral y Helinski, se descartó la posible presencia de un plásmido críptico en la cepa W3110, (Figura 9). Por transducción generalizada con el bacteriófago P1, cml, clr-100 se construyó el juego isogénico (Figura 4).

8. TRANSDUCCION DE cya⁻.

Para transducir la mutación cya⁻ se intentó primeramente obtener una mutante resistente a valina exógena (val^r) espontánea de la cepa JK8306 (cya⁻) en el minuto 83 (34), esto nos facilitaría la transferencia de cya, efectuando la selección a Val^r. La frecuencia para obtener una mutante Val^r espontánea es de 10⁻⁷ (14), en las cepas

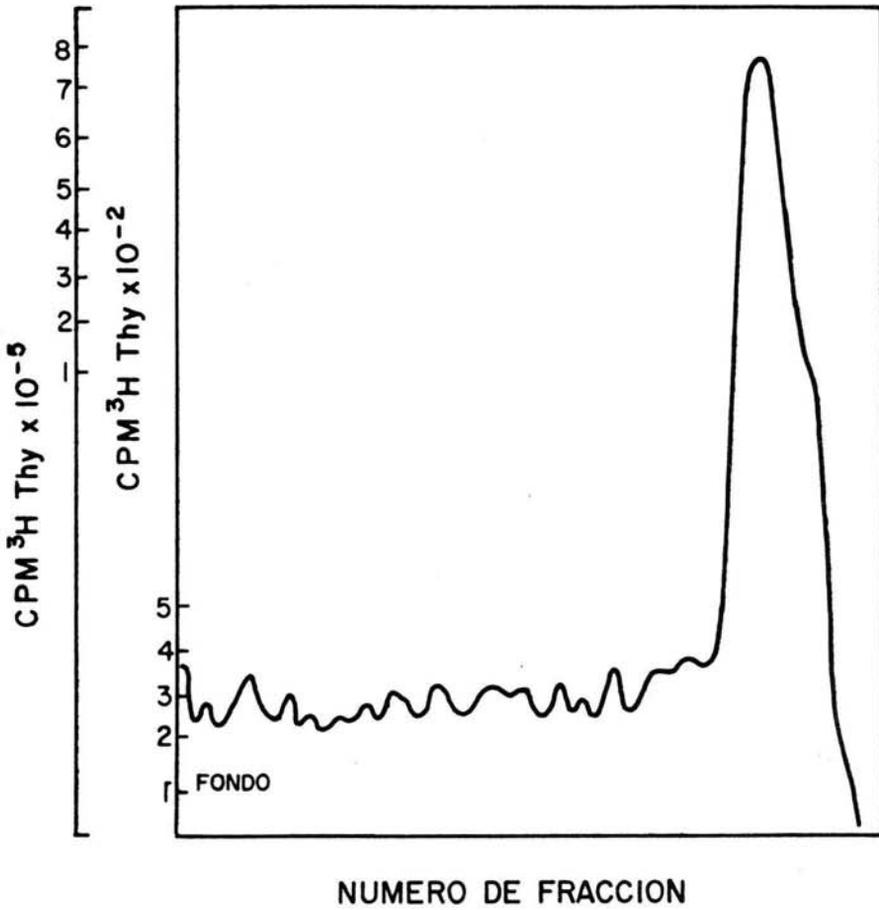


Figura 9. Gradiente isopícnico de CsCl-Bromuro de etidio para determinar plásmidos en la cepa W3110.

JK8306 y 5080 la frecuencia fue de cuatro órdenes de magnitud mayor (10^{-3}) que la ya reportada. Glover (14) determinó que el fenómeno de resistencia a valina exógena en E. coli K-12 puede ser abatida por concentraciones muy bajas de leucina, a pesar de haber realizado varios ensayos con diferentes reactivos para descartar la posible contaminación, jamás pudo ser abatida la alta frecuencia de Val^r espontáneas y por consiguiente la inestabilidad de éstas, ya que en la purificación revertían su fenotipo por lo que decidimos cambiar la estrategia.

Un segundo criterio para obtener la transductante cya⁻ consistió en enriquecer la población mal⁻ con ampicilina y el bacteriófago lambda virulento. El primer método fracasó, ya que no se pudo obtener una candidata estable. Con el segundo método de enriquecimiento poblacional de Mal⁻, con el bacteriófago lambda, se lograron aislar 50 candidatas Mal⁻, de las cuales únicamente resultaron 29 clones (40%) correspondientes al fenotipo Cya⁻.

9. TRANDUCCION DE crp A LAS CEPAS W3110 Y W3110 cya.

La frecuencia de co-transducción de crp y resistencia a Sm es de un 75%, con esta frecuencia fue fácil de aislar las mutantes deseadas probando su habilidad para fermentar maltosa en medio MacConkey (ver Tabla 11).

TABLA 12

FENOTIPO DE LAS CEPAS DEFICIENTES EN REPRESION CATABOLICA

CEPA	FENOTIPO RELEVANTE	M9,B1	M9,His	Mac.Mal	Mac.Mal AMP _c	L-Sm
JK8000	Cya ⁺ Crp ⁺	+	-	+	+	+
JK8306	Cya ⁻	+	-	-	+	+
JK8000	Crp ⁻	+	-	-	-	-
JK8445	Cya ⁻ Crp ⁻	+	-	-	-	-
SA500	lon ⁺	-	+	+	+	+
JS.13.14	lon ⁻	-	+	+	+	+
5080	lon ⁺ Cya ⁺	-	+	-	+	+
5060	lon ⁻ Crp ⁻	-	+	-	-	+

Las cepas bacterianas se purificaron por estria en medio L y por picadura con palillo se transfirieron cinco clonias a los diferentes medios, se incubaron a 37°C por 24-48 hrs.

En el Medio de MacConkey maltosa con y sin AMP_c: + fermentación
- no fermentación

En los demás medios: + crecimiento
- no crecimiento

DISCUSION

La observación de la pérdida de enterotoxina ST en cepas deficientes en represión catabólica y la suposición de que ésta se localizara en un transposón, como se había demostrado con otra enterotoxina (41), sugería fuertemente que el fenómeno de transposición estuviera sujeto a represión catabólica.

Un sistema excelente para demostrar nuestra hipótesis lo proporciona el plásmido RP4, el cual presenta la producción de la beta-lactamasa en un transposón; con este modelo y el juego isogénico deficiente en represión catabólica la problemática es fácil de abordar.

Al recibir la noticia del Dr. J. Schrenk en donde nos comunicaba que al aislar mutantes *crp* necesariamente presentaban la mutación *lon* para poder subsistir, nos vimos obligados a utilizar un juego isogénico para *lon*⁺.

El fenómeno de transposición fue observado en varios casos (Tablas 8, 9 y 10) de los que se pueden hacer las siguientes sugerencias:

Nuestra hipótesis original trataba de demostrar que el fenómeno de la transposición estaba regulado por la represión catabólica, esto es, mutaciones en los genes *cya* y

crp favorecían dicho fenómeno. El hecho de que la cruza entre las cepas 5080 cya y J54 no se presente este fenómeno y los resultados de la Tabla 10 sugieren lo contrario, es decir, que la transposición está regulada negativamente por la represión catabólica debido a que se observa un incremento del fenómeno en la cruza entre las cepas JK8306 cya⁻ y J54 en presencia de AMPc.

Al observar la transposición en todas las cepas crp⁻ se puede pensar que esta proteína tenga algún proceso regulatorio en la expresión de las transposasas actuando como un represor de éstas.

Otra responsable de la transposición pudiera ser la mutación Lon⁻ ya que se observa este fenómeno en todas las cepas que se sabía que presentaban la mutación y en aquéllas que se sospechaba por el comentario del Dr. J. Schrenk.

Una alternativa más para explicar la disociación del plásmido es la presencia del plásmido críptico ya que se encuentra en todas las cepas que presentaron la transposición; pudiendo no ser exclusivamente un producto de éste, sino el favorecimiento por ser un replicón independiente, esto es, como un medio que usara el Tn1 inducido por lon⁻ y/o cya⁻ - crp⁻, ya que en el caso particular de la cruza JK8000 que presenta el mismo plásmido que la cepa JK8307

crp^- (Figura 7) no se detectó la transposición con la primera cepa y sí con la segunda.

En resumen, con estos datos no se puede determinar el o los responsables de la transposición, ya que se requieren otros ensayos; tales como:

Primeramente se sugiere confirmar la presencia de la mutación lon^- en las cepas JK8307 crp , JK8445 $cya-crp$ y 5060 $lon\ crp$; transduciéndoles primeramente el gene silvestre para revertir la mutación cya y crp , efectuando la selección en medio mínimo suplementada con maltosa como única fuente de carbono con lo cual vamos a obtener revertantes cya^+ y/o crp^+ . Para el caso de la doble mutante JK8445 $cya-crp$, se sugiere transducir crp^+ y seleccionar en medio mínimo con maltosa y en presencia de AMPc; posteriormente transducir cya^+ y seleccionar en el mismo medio pero sin AMPc. Ya obtenidas las revertantes se aplicarían los tres criterios empleados para determinar el fenotipo lon^- (filamentación y mucosidad celular y sensibilidad a luz ultra violeta).

Una vez que se haya construido el juego isogénico deficiente en represión catabólica y libre del plásmido críptico, realizar nuevamente la cruce con el plásmido RP4 y medir la transposición.

BIBLIOGRAFIA

1. Adler, H.I. and A.A. Hardigree. 1964. Analisis of a gene controlling cell division and sensitivity to radiation in E. coli. J. Bact. 87: 720-726.
2. Bachmann, J.B., et al, 1976. Recalibrated linkage map of E. coli K-12. Bacteriol. Rev. 40: 116-167.
3. Bazaral, M., and D.R. Helinski. 1970. Replication of a bacterial plasmid and an episome in E. coli. Biochemistry. 9: 399-406.
4. Black, W.A. and R.W.A. Girdwood. 1969. Carbenicillin resistance in Pseudomonas aeruginosa. Brit. Med. J. 4: 234.
5. Breckenridge, L. and L. Gorini. 1969. Genetic analysis of streptomycin resistance in E. coli. Genetics. 65: 9-25.
6. Brickman, E. et al. 1973. Genetic characterization of mutations which affect catabolite sensitive operons in E. coli, including deletions of the gene for adenyl cyclase. J. Bact. 116: 582.
7. Broda, P. 1979. Plasmids. W.H. Freeman and Company Oxford and San Francisco.
8. Bukhari, A.I., et. al. 1977. DNA Insertion elements, Plasmids and episomes. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
9. Bush, J.W. and A. Markovitz. 1973. The genetic bases of mucoidy and radiation sensitivity in cap R (lon) mutants of E. coli K-12. Genetics. 74: 215-225.
10. Chakrabarty, A.M. 1976. Plasmids in Pseudomonas. Ann. Rev. Genet. 10:7.
11. Cohen, S.N. 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. Nature. 263: 731-738.
12. Datta, N., et al. 1971. Properties of an R factor from Pseudomonas aeruginosa. J. Bac. 108: 1244-1249.
13. De Crombrogge, F., et al. 1969. Regulation of inducible enzyme synthesis in E. coli by cyclic adenosine 3'-5' monophosphate. J. Biol. Chem. 244: 5828.
14. Glover, S.W. 1962. Valine resistant mutants of E. coli K-12. Genet. Res. 3:448
15. Gottesman, S. and Zipser D. 1978. Deg. Phenotype of E.

- coli lon mutants. J. of Bact. 133: 844-851.
16. Guiso, N. and A. Ullman. 1976. Expression and regulation of lactose genes carried by plasmids. J. Bact. 127: 691.
 17. Hedges, R.W. and A.E. Jacob. 1974. Transposition of ampicillin resistance form RP4 to other replicons. Mol. Gen. Genet. 132: 31.
 18. Heffron, F., et al. 1975. Origin of the TEM beta-lactamase gene found on plasmids. J. Bact. 122: 250-256.
 19. Howard-Flandars, P., et al. 1964. A locus that controls filament formation and sensitivity to radiation in E. coli K-12. Genetics. 49: 237-246.
 20. Ikeda, H. and J.I. Tomizawa. 1965. Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. J. Mol. Biol. 14: 85.
 21. Kline, E.L., et al. 1975. Effect of a leu-linked mutation of the valine sensitivity of acetohydroxy acid synthase activity in E. coli J. Bac. 121: 491-496.
 22. Lederberg, J. et al. 1952. Sex compatibility in E. coli Genetics. 37: 720.
 23. Lenneth, E.H., et al. 1974. Manual of clinical Microbiology. Second Edition. American Society for Microbiology. 410-417.
 24. Martinez, C.M.G., et al. 1981. Catabolite repression of E. coli heat-stable enterotoxin activity. J. Bact. 145: 722-728.
 25. Meynell, F.F. and A.M. Lawn. 1968. Filamentous phages specific for the I sex factor. Nature 217: 1184:1186.
 26. Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
 27. Nomura, M. 1967. Colicins and related bacteriocins. Ann. Rev. Microbiol. 21: 257.
 28. Normark, S. et al. 1977. E. coli K-12 mutants hiperproducing chromosomal beta-lactamase by gene repetitions. J. Bact. 132: 912-922.
 29. Ørskov I y F. Ørskov. 1966. Episome-carried surface antigen K88 of E. coli. I- Transmission of the determinant of the K88 antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. J. Bact. 91: 69.

30. Ozeki, H. et al. 1961. Colicine factors as fertility factors in bacteria. Nature. 190: 986-989.
31. Pastan, I. and S. Adhya. 1976. Cyclic adenosine 5'-monophosphate in E. coli. Bacteriol. Revs. 40: 527.
32. Perlman, R.L. and I. Pastan. 1969. Pleiotropic deficiency of carbohydrate utilization in an adenylyl cyclase deficient mutant of E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37: 151.
33. Pledger, W.J. and H.E. Umbarger. 1973. Isoleucine and valine metabolism in E. coli XII. Mutations affecting de-repression and valine resistance. J. Bacteriol. 114: 183-194.
34. Ramakrishnan, T. and E.A. Adelberg. 1965. Regulatory mechanisms in the biosynthesis of isoleucine and valine. III. Map order of the structural genes and operator genes. J. Bacteriol. 89: 661-664.
35. Randall-Hazelbauer, L. and M. Schwartz. 1973. Isolation of the bacteriophage lambda receptor form E. coli. J. Bac. 116: 1436-1446.
36. Richmond, M.H. and Syker, R.B. 1972. The chromosomal integration of a beta-lactamase gene derived from P-type R factor RP1 in E. coli. Genet. Res. 20: 231.
37. Rossi, J.J. and C.M. Berg. 1971. Differential recovery of auxotrophs after penicillin enrichment in E. coli. J. Bact. 106: 297-300.
38. Sabourin, D. and J. Beckwith. 1975. Deletion of the E. coli crp gene. J. Bact. 122: 338.
39. Smith, H.W. y S. Halls. 1967. The transmissible nature of the genetic factor in E. coli that controls Haemolysin production. J. Gen Microbiol. 47:153.
40. Smith, H.W. and S. Halls. 1968. The transmissible nature of the genetic factor in E. coli that controls enterotoxin production. J. Gen. Microbiol. 52: 319.
41. So, M. et al. 1979. The E. coli gene encoding heat-stable toxin is a bacterial transposon flanked by inverted repeats of IS1. Nature (London) 277: 453-456.
42. Stieglitz, H.K. et al. 1980. Linkage of heat-stable enterotoxin activity and ampicillin resistance in a plasmid isolated from an E. coli strain of human origin. Infect.Immun. 30: 617-620.

43. Takano, T. 1971. Bacteriophage mutants defective in plasmid formation requirement for the lon allele. Proc.Natl.Acad. Sci. 68: 1469-1473.
44. Truitt, C.L., et al. 1976. Interaction of the host and viral regulatory mechanisms: effect of the lon cell division defect on regulation of repression by bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 105: 231-244.
45. Watanabe, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev. 27: 87.
46. Willetts, N.S. 1972. The genetics of transmissible plasmids. Ann. Rev. Genet. 6: 257-268.
47. Witkin, E.M. 1969. Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. Ann.Rev. Genet. 3: 525-552.
48. Zaenen, I. et al. 1974. Supercoiled circular DNA in grown-gall inducing Agrobacterium strains. J. Mol. Biol. 86: 109-127.