



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMPORTAMIENTO DE UN ELEMENTO GENÉTICO  
MOVIL (SECUENCIA DE INSERCIÓN IS<sub>1</sub>) EN  
DIFERENTES ENTEROBACTERIAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(BIOQUÍMICA)

PRESENTA

JAIIME AMADEO BUSTOS MARTINEZ

México D. F. 1986

00562  
1  
14

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

## I N D I C E

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	12
Hipótesis	23
Objetivos	23
Material y Métodos	25
Resultados	37
Discusión	74
Conclusiones	80
Bibliografía	81

## R E S U M E N

Las bacterias pueden contener secuencias de DNA capaces de insertarse o transponer en diferentes regiones del material genético. Estas secuencias o elementos genéticos móviles (EGM), inducen alteraciones en la expresión de genes así como rearrreglos moleculares en el genoma bacteriano. Uno de los EGM ampliamente estudiado es la secuencia de inserción 1 (IS<sub>1</sub>), que frecuentemente se localiza en plásmidos. Esta secuencia se encuentra de manera repetida en el cromosoma de varios géneros bacterianos (Escherichia, Shigella, Klebsiella, etc.) pero está ausente en otros (Salmonella, Proteus, etc.).

La presencia de esta secuencia en el cromosoma de las bacterias, puede influir en la regulación de ella misma o de otras secuencias IS<sub>1</sub> que penetran en la célula, debido a la posible producción de factores difusibles que actúen induciendo o reprimiendo genes.

El objetivo principal de este trabajo fué determinar la frecuencia de transposición y de recombinación de la IS<sub>1</sub> en enterobacterias, que tienen un número de copias diferentes de esta secuencia en el cromosoma: Escherichia, Shigella y Salmonella.

Primero se estudió si las cepas de Shigella y Salmonella aisladas en México, contienen un número de copias de IS<sub>1</sub> similares al reportado en otros países. También se precisó su localización, para determinar adecuadamente tanto el número de copias como la frecuencia de transposición, ya que para esto se requiere que la secuencia no se encuentre en plásmidos.

Las Shigellas estudiadas contienen más de cuarenta copias en el cromosoma, mientras que sólo una de las Salmonellas contiene IS<sub>1</sub> en el cromosoma (8 copias).

En todas las Shigellas la IS1 se localizó principalmente en el cromosoma, sólo una cepa la presentó en plásmidos pequeños y tres en plásmidos grandes, a pesar de que todas las cepas estudiadas contienen varios plásmidos pequeños.

En una cepa de Shigella, se trataron de eliminar estos plásmidos para cuantificar de manera más precisa la frecuencia de transposición de la IS1. Esto no fue posible, debido a que los plásmidos pequeños de Shigella no se eliminaron con los métodos utilizados para plásmidos tipo ColE1 de E. coli. Además, estos plásmidos, a pesar de tener secuencias homólogas con ColE1, son compatibles con este plásmido y no requieren de la DNA polimerasa I para su replicación.

La frecuencia de transposición y de recombinación de la IS1 se estudiaron en cepas cuyo número de copias en cromosoma era el siguiente: E. coli 8, Shigella 56 y Salmonella 0.

En E. coli y en Shigella, las dos IS1 del plásmido R100 recombinaron a baja frecuencia, mientras que en Salmonella (sin IS1 o con 8 copias), recombinaron a una frecuencia más alta. Esto sugiere que la frecuencia de recombinación de estas IS1 no se modifica por la presencia o ausencia de IS1 en el cromosoma, sino que depende de factores propios de la célula huésped.

La frecuencia de transposición simple, inversa y la formación de cointegrados, fue mayor en Salmonella, después en Shigella y por último en E. coli. Este resultado sugiere que las IS1 del cromosoma, reprimen la frecuencia de transposición de otras IS1. Las diferencias de represión entre Shigella y E. coli pueden deberse a la presencia de iso-secuencias de inserción en ambas bacterias que presentan una actividad diferente.

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

Las enterobacterias constituyen una familia de bacilos gramnegativos capaces de crecer en condiciones aerobias y anaerobias. La mayoría de estas bacterias, se encuentran en el intestino del hombre y de otros animales formando parte de la flora normal. Algunos géneros son patógenos y producen diarreas, gastroenteritis, fiebre entérica y otras enfermedades gastrointestinales. Las enterobacterias están relacionadas estrechamente entre sí en cuanto a su morfología, estructura, bioquímica y configuración antigénica.

Dentro de esta familia se encuentran tres géneros importantes: Escherichia, Salmonella y Shigella. En el género Escherichia las bacterias son patógenas sólo en ciertas circunstancias. Dentro de este género está Escherichia coli, que es el más importante modelo bacteriano estudiado.

Los bacilos del grupo Salmonella son todos patógenos en mayor o menor grado; son parásitos obligados y constituyen un grupo formado de varias especies relativamente homogéneas. El género Shigella tiene relación incierta con los otros bacilos intestinales, aunque se le considera muy similar a Escherichia coli (18).

Se ha detectado poca homología genética (40-50%) entre los cromosomas de E. coli y Salmonella, mientras que los experimentos de hibridización E. coli-Shigella, revelan que los cromosomas de las dos especies muestran un considerable grado de homología (80-90%); sin embargo, esta homología es gruesa y no se extiende a nivel de genes únicos (17,57,86,99).

Hay una buena evidencia genética de que los géneros Escherichia, Salmonella y Shigella están filogenéticamente relacionados (18).

Las enterobacterias exhiben una variedad genética considerable,

debido a su estrecha asociación física y ecológica en su habitat natural. Las condiciones de la ecología bacteriana, pueden promover el intercambio de información genética, lo cual puede explicar las reacciones fisiológicas comunes, constituyentes antigénicos compartidos y la resistencia multiple a medicamentos. Esto último es de importancia ya que aunque se han encontrado bacterias entéricas con resistencia a medicamentos en áreas geográficas en las que el antibiótico no se ha usado previamente, la frecuencia de cepas resistentes a medicamentos aumenta notoriamente en donde se utilizan los antibióticos en forma extensa para tratamiento o profilaxis (55).

Esto constituye un gran problema de salud pública, debido a que no se pueden controlar de manera adecuada los procesos infecciosos si no se conoce el patrón de resistencia a antibióticos de las bacterias a tratar, ya que muchas veces el antibiótico más utilizado es el menos efectivo.

A partir de 1955 (77) en México se han detectado cepas de Shigella flexneri resistentes a cloramfenicol (Cm), tetraciclina (Tc) y estreptomycin (Sm). Su frecuencia ha aumentado con los años. Con la introducción de antibióticos como ampicilina (Ap), aminoglicosidos y cefalosporinas, han aparecido también cepas resistentes a ellos.

En años recientes, un estudio realizado en la Cd. de México (55), mostró que de las cepas de Salmonella analizadas, el 20.5% portaba resistencia a 8 ó más antibióticos, mientras que las cepas de Shigella presentaron resistencia a no más de 7 antibióticos y en E. coli enterotoxigénica se detectaron hasta 11 resistencias. De las Salmonellas, el 30% fue resistente a Ap, carbenicilina (Cb) y kanamicina (Km). En las Shigellas el 56.5% de las cepas fue resistente a Cm, Sm y sulfonamidas (Su). Esto indica diferentes patrones evolutivos, en cuanto a la adquisición de resistencia a drogas, entre estos dos géneros.

La adquisición de resistencia a drogas así como la variación genética, se realiza mediante la mutación y el intercambio de genes.

Las bacterias disponen de tres mecanismos principales para intercambiar su información genética: conjugación que requiere contacto celular; transducción mediada por fagos y la transformación en la cual fragmentos de DNA liberados en la lisis de una célula penetran en otra.

Estos procesos implican la participación de elementos genéticos extracromosómicos como son los fagos y los plásmidos.

Los fagos median la transferencia de genes por el proceso de transducción. En este evento, el fago encapsula DNA del cromosoma o plásmidos de la célula infectada y lo lleva a las nuevas células que infecta. El proceso puede ser transducción especializada, donde sólo ciertos genes donadores son transmitidos, o transducción generalizada, donde cualquier segmento puede ser transmitido por el fago.

Los plásmidos son moléculas de DNA circular cerrado que se replican autónomamente. Su tamaño varía desde alrededor de 1.5 Kilobases (Kb) o sea 1 Megadalton (Mdal), para ciertos plásmidos crípticos, lo cual es suficiente información para codificar una o dos proteínas; hasta 150 Kb en plásmidos tipo F', lo que equivale al 2% del cromosoma de E. coli (71).

En la naturaleza se presentan dos tipos de plásmidos: unos con replicación "relajada" o de alto número de copias (tipo Col) y otros con replicación "restringida" o de bajo número de copias (tipo F y R) (70).

Los plásmidos con alto número de copias son también conocidos como plásmidos pequeños o no conjugativos, ya que no pueden llevar a cabo este proceso; tienen un peso molecular (P.M.) de 1,5 a 10 Mdal y por lo general existen de 10 a 30 ó más moléculas del plásmido por

cromosoma del huésped (30, 70),

Los plásmidos de bajo número de copias, o plásmidos grandes, frecuentemente son conjugativos y se encuentran de una o dos copias por genoma del huésped (4,70). Estos plásmidos tienen de 40 a 80 Mdal o más y son capaces de promover la transferencia conjugativa de ellos mismos, de plásmidos no conjugativos y del cromosoma del huésped por un proceso llamado conducción.

A pesar de que los plásmidos pequeños no son conjugativos, estos pueden pasar de una célula a otra por el proceso de movilización o conducción. Para que este evento se lleve a cabo, se requiere la presencia de un plásmido conjugativo (F ó R), cuyo operón tra codifica para los pili específicos de la conjugación. El plásmido no conjugativo debe contener dos secuencias esenciales para su transferencia: un sitio en cis y una región que codifica productos en trans (93). El sitio en cis llamado hom, es la secuencia que es reconocida por los productos en trans para empezar la transferencia. Algunos plásmidos no presentan estos genes y no pueden ser movilizados aunque esté presente el pili de conjugación,

Para su replicación, los plásmidos no conjugativos requieren de la DNA polimerasa I, mientras que los conjugativos, igual que el cromosoma, requieren de la DNA polimerasa III (53).

La propiedad de incompatibilidad también ha servido para clasificar a los plásmidos. Dos plásmidos pertenecen a un mismo grupo de incompatibilidad si no pueden coexistir establemente en la célula huésped. Después de varias generaciones, las células en la población contienen uno u otro de los plásmidos, pero no los dos. En los plásmidos grandes, esto puede deberse a la competencia por receptores de membrana para su segregación adecuada (68), mientras que en los no conjugati

vos el factor limitante aparentemente es un represor de la replicación (RNA I); la afinidad de este por las regiones reguladoras de replicación de los plásmidos determina cual se replica más eficientemente y por tanto cual predominará en la población (34). Si se tienen plásmidos con genes de replicación similares se observará incompatibilidad, si son diferentes, los plásmidos podrán convivir establemente.

Los plásmidos en ocasiones pueden eliminarse de las bacterias por el proceso llamado curación. Para esto se utilizan sustancias químicas o antibióticos que interfieren con la replicación del plásmido. Entre las sustancias más utilizadas se encuentran: bromuro de etidio y naranja de acridina, que se intercalan en el DNA (5,14); rifampicina, que inhibe la transcripción del RNA iniciador de la replicación (6); novobiocina, que inactiva a la girasa (98) y trimetoprima, que selecciona positivamente a células con mutaciones en el gene de la DNA polimerasa I (polA), la trimetoprima únicamente cura plásmidos que requieren a esta enzima (65).

Los plásmidos confieren ventaja a la célula huésped debido a que portan genes que aunque no son esenciales, favorecen ciertos procesos como: resistencia a antibióticos, metales pesados, luz ultravioleta, fagos específicos y al suero; producción de bacteriocinas, toxinas, factores que aumentan la virulencia, hemolisinas y antígenos de superficie (28,69). Algunos plásmidos también llevan genes para el mecanismo de modificación-restricción (9).

Esto último es de importancia para el intercambio genético debido a que el mecanismo de modificación-restricción es un proceso por medio del cual las células reconocen y degradan DNA "extraño" que penetra en su interior. El mecanismo comprende dos proteínas diferentes. Una de ellas es una endonucleasa de restricción que corta al DNA no modificado (extraño) y la otra es una metilasa que modifica esa secuencia especí-

fica del DNA metilándolo, en forma tal que ya no es reconocida como sustrato por la enzima de restricción correspondiente (2,19). La degradación del DNA no metilado es complementada por la acción de las exonucleasas presentes en el medio.

Además del sistema de modificación-restricción, existen otras limitantes a la transferencia genética entre las bacterias.

Los plásmidos se transfieren como moléculas replicativas, independientes del cromosoma, únicamente entre bacterias que pueden formar pares conjugativos y que son además capaces de replicarlas eficientemente. La mayoría de los plásmidos se transfieren únicamente entre géneros y especies de bacterias muy similares; sin embargo, algunos plásmidos denominados promiscuos lo hacen incluso entre bacterias diferentes. A la fecha aún no se ha demostrado la transferencia de plásmidos entre bacterias gramnegativas y grampositivas.

Los fagos y los plásmidos integrados, transfieren genes cromosomales de una bacteria a otra cuando éstas no son muy diferentes. Además, se requiere de gran homología entre el DNA transferido y el DNA receptor para que el primero se integre por recombinación al cromosoma receptor.

El intercambio genético entre moléculas no homólogas de DNA puede realizarse a través de los elementos genéticos móviles (EGM).

Los EGM pueden definirse como entidades genéticas que son capaces de insertarse en sitios nuevos sobre el mismo replicón que los porta o sobre otros replicones, generalmente sin perderse del lugar original. Este proceso, conocido como transposición o recombinación ilegítima es independiente de las vías de recombinación dependientes de homología (20, 31, 54, 62).

Los EGM pueden dividirse en:

a) Secuencias de Inserción (IS).

- b) Transposones simples (Tn; familia Tn<sub>3</sub>).
- c) Transposones compuestos (Tn).
- d) Bacteriófagos que transponen.

Las IS son segmentos generalmente menores de 2 Kb, presentan genes que están relacionados únicamente con la función de inserción. Pueden encontrarse como componentes individuales en el cromosoma bacteriano. Los Tn son mayores de 2 Kb y contienen genes adicionales no relacionados con la función de inserción, como genes de resistencia a antibióticos, producción de toxinas, utilización de lactosa, etc. Los Tn compuestos, al igual que los Tn simples, contienen genes adicionales no relacionados con la función de inserción, también pueden llevar fragmentos de cromosoma o de plásmidos, pero estos genes o segmentos están flanqueados por IS, por lo que su tamaño es mucho mayor de 2 Kb, encontrándose Tn de hasta 40 Kb. Dentro de los bacteriófagos que transponen se conoce a Mu cuyo ciclo de vida requiere de su inserción en el cromosoma, por un mecanismo de transposición (20,31,48,54, 62,89).

Todos los EGM tienen varias características en común: a) en sus extremos tienen secuencias invertidas repetidas (IR) de 10-40 pares de bases (pb); b) las IR flanquean una región central que contiene secuencias con fases de lectura abiertas que codifican funciones de transposición; c) la inserción en su sitio blanco induce una duplicación de 3 a 12 pb del DNA blanco, que queda flanqueando al transposón como secuencias repetidas directas (20,31,54).

Los EGM promueven rearrreglos en los replicones que los contienen, estos rearrreglos pueden ser intermoleculares, intramoleculares o rearrreglos que implican a ambos. Dentro de los primeros se tiene la transposición y la formación de cointegrados (fusión de replicones), en los segundos se encuentra la transposición, la inversión y la delección; en

el último caso tenemos las inserciones adyacentes y la transposición inversa. También pueden producir: mutaciones por inserción dentro de un gene o por activación o inactivación de genes vecinos; integración de plásmidos tipo F, R o fagos en el cromosoma, cuando estos portan un EGM; diversos tipos de excisión (pérdida del EGM) y rearrreglos que involucran segmentos largos de DNA como son la duplicación en tandem, la amplificación y deleciones e inversiones (20,31, 48,54,62,87, 89,96).

La transposición involucra los siguientes pasos: (1) reconocimiento del sitio blanco; (2) rompimiento preciso del DNA en los extremos del EGM y en sitio "blanco"; (3) unión al sitio "blanco"; (4) replicación del EGM; (5) duplicación de unas pocas pb de la secuencia "blanco" y (6) resolución de intermediarios si es que los presenta. Las proteínas involucradas en el proceso son las transposasas y en ocasiones las proteínas de resolución llamadas resolvasas (8,35).

Actualmente se proponen tres modelos para explicar este fenómeno. El primero y más simple es el de la transposición conservativa, el cual fue desarrollado en base al Tn<sub>5</sub>, donde no se observa duplicación del EGM. El segundo modelo es el replicativo, que fue desarrollado en base al Tn<sub>3</sub>, donde el elemento sufre una duplicación al formar cointegrados. El tercer modelo es el del círculo rodante, y se basa en la premisa de que todas las transposiciones son replicativas. Este modelo se desarrolló en base a los resultados obtenidos con la IS<sub>1</sub> y Mu (8).

Sin embargo, ninguno de estos modelos explica satisfactoriamente algunos de los aspectos de la transposición.

En realidad, se conoce poco de los factores que influyen tanto en la regulación, como en el proceso de transposición. Algunos factores pueden ser codificados por los EGM, otros por el cromosoma o por plásmidos o pueden ser factores fisiológicos tales como temperatura,

condiciones de crecimiento y estado de las células. Estos factores también pueden ejercer cierta influencia en el número de copias, actividad específica y la diversidad de huéspedes de los EGM.

Estos elementos móviles, tienen múltiples papeles en alteraciones genéticas: pueden generar nuevas señales reguladoras y nuevos genes por una variedad de mecanismos diferentes como son la fusión de genes, la amplificación, la fusión de operones, la generación y decaimiento de transposones, la fusión de replicones y la segregación de replicones (20,31,48,54,62,89,96).

A largo plazo, pueden mediar la movilización de cualquier gene por transferencia horizontal, es decir, mediante la asociación de genes funcionales con plásmidos que facilitan la distribución horizontal de los genes bacterianos a organismos relacionados o distantes. Esto produce que los microorganismos obtengan ventaja selectiva para su adaptación a condiciones del medio ambiente, cuando contienen los EGM (21,92).

Se puede decir que los EGM son agentes básicos de importancia primaria, para la variabilidad genética a nivel individual y de población, a través de rearrreglos que actúan vertical y horizontalmente cambiando genes, lo cual puede representar uno de los principales recursos para la evolución.

Por este motivo es de gran importancia conocer de manera más precisa los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de transposición, regulación y diseminación de los EGM en los diferentes microorganismos.

Debido a esto, se decidió estudiar una de las IS de la cual se tiene más información por su importancia genética y sencillez de estudio: la secuencia de inserción IS<sub>1</sub>.

## A N T E C E D E N T E S

La IS1 es el elemento de inserción más pequeño conocido, tiene una longitud de 768 pb, contiene en sus extremos secuencias repetidas de 35 pb con una homología imperfecta (Fig. 2). La IS1 ha sido secuenciada en su totalidad, por lo que se cuenta con un mapa de restricción adecuado (51,76).

La IS1, a diferencia de la mayoría de las IS, no presenta un marco de lectura largo, por lo que no puede codificar para un polipéptido grande, sin embargo, posee cinco marcos de lectura para proteínas pequeñas (27,37). Para caracterizar los productos de IS1, se clonaron por separado varios fragmentos de DNA, que contenían diferentes fases de lectura, en un plásmido y se analizó la expresión de estos fragmentos en minicélulas. Únicamente uno de los fragmentos expresó una proteína (Ins A), que tiene un P.M. de 10.6 Kd (27). Ins A tiene una gran homología con una región de las proteínas ci y cro del fago  $\lambda$  y de la proteína CAP, que son proteínas involucradas en el reconocimiento de secuencias específicas de DNA (27). Ins A es una proteína muy básica, característica de muchas proteínas que se unen a DNA.

No se han detectado señales de terminación de la transcripción dentro de la IS1, pero hay codones de terminación de la traducción en las tres posibles fases de lectura, dentro de las primeras 27 pb de sus extremos (27,60).

La IS1 se ha detectado en el cromosoma de varias bacterias, principalmente en la familia Enterobacteriaceae (16,43,72,75,84).

Las cepas de E. coli y Shigella son las que contienen el mayor número de IS1. Las cepas de E. coli K12 presentan alrededor de 8 copias, sin embargo las cepas de E. coli aisladas de diferentes huéspedes y en diferentes regiones, presentan de 4 a 10 copias (16,43,72,66). Del gé-

nero Shigella unicamente se ha analizado una cepa de cada especie: dy-  
senteriae, sonnei, flexneri y boydii (72,75). Todas, con excepción de  
Sh. boydii que tiene 2 copias, presentaron más de 30 copias; sin em-  
bargo, la metodología que se utilizó no permite una cuantificación  
exacta.

En el caso del género Salmonella, las cepas de S. typhimurium  
que se han estudiado no presentan IS1 en el cromosoma (72); sin em-  
bargo, hay un reporte donde una cepa de S. typhimurium al menos tie-  
ne una copia (66). En este caso no se determinó si la IS1 se encuen-  
tra en el cromosoma o en un plásmido.

La distribución de la secuencia IS1 en las diferentes bacterias  
no correlaciona con la relación taxonómica o filogenética de estas  
bacterias, ya que cepas como S. typhimurium, Citrobacter freundii y  
Edwardsiella tarda no contienen IS1 y están más relacionadas a E.coli  
o Shigella, que otras cepas que sí presentan IS1 como son Klebsiella  
aerogenes o Serratia marcescens (16,43,66,72,75,84).

Esto hace pensar que la transferencia lateral de la IS1 de una  
cepa bacteriana a otra, ocurre después de que estas bacterias han di-  
vergido filogenéticamente, o que su capacidad de transposición no es  
suficiente para llevar la secuencia a través de un amplio rango de  
especies bacterianas, o que en algunas cepas las IS1 transponen poco  
o son inestables.

El que ésta secuencia se está reorganizando constantemente en el  
cromosoma queda de manifiesto al encontrarse las llamadas isosecuen-  
cias de inserción en Sh. dysenteriae (75), esto es, tipos de IS1 que  
tienen algunos cambios en su secuencia de nucleótidos. La comparación  
se hace tomando como base la IS1 presente en E. coli K12, ahora lla-  
mada IS1 K. En la Sh. dysenteriae se ha encontrado la IS1 R que tie-  
ne 7 pb cambiadas y la IS1 D que presenta 10 pb diferentes con res-

pecto a IS1 R.

Recientemente se han encontrado otras dos iso-IS1, la IS1 F en Sh. flexneri y la IS1 T, que está insertada en el gene lacZ de una cepa de E. coli (60,75).

Por otro lado, el elevado número de copias de IS1 en ciertas bacterias, en especial del género Shigella, aumenta la probabilidad de que se efectúen rearrreglos genéticos y de que se generen nuevos transposones, ya que se sabe que si dos secuencias IS1 se encuentran relativamente cerca, el DNA flanqueado por ellas se convierte en transposón (transposón compuesto) (46). En estas bacterias, es posible también la generación de transposones a partir de plásmidos. Si el plásmido contiene genes de resistencia, existe la posibilidad de que se conviertan en transposones compuestos, si dos IS1 transponen a partir del cromosoma y quedan flanqueando sus extremos.

La IS1 se encuentra también en algunos fagos como el P1 y en plásmidos como el R1, R6, R1-16, R1-19 y R100 (44). Estos plásmidos confieren resistencia a múltiples antibióticos, por lo que son importantes clínicamente.

La mayoría de los genes de resistencia de estos plásmidos están agrupados en una región llamada determinante de resistencia (r-det); esta región, de aproximadamente 20 Kb está flanqueada por dos copias de IS1 en sentido directo (78), la otra región del plásmido, denominada RTF, contiene los genes para replicación y transferencia.

El que los genes de resistencia a las drogas estén agrupados entre dos IS1 sugiere que el r-det puede tener un papel funcional, como sería la transmisión de los genes de resistencia como una unidad de un replicón a otro. Esto puede ocurrir mediante transposición pero a muy baja frecuencia (3).

El comportamiento molecular de estos plásmidos sugiere que efec-

tivamente, el r-det es una unidad de información. El r-det puede disociarse mediante su circularización, vía recombinación entre las dos IS1 que están de manera directa; para esto se requieren los genes recA y rec BC del huésped (22).

Las copias circulares del r-det tienen una sola copia de IS1 que puede mediar su cointegración con otro replicón o integrarse vía recombinación homóloga con una IS1 localizada en otro replicón. Se ha observado que el r-det del plásmido R1-19 se transfiere de un replicón a otro por circularización y subsecuente recombinación recíproca entre la IS1 del r-det y una copia del replicón receptor, este proceso ocurre a una frecuencia relativamente alta (23).

La frecuencia de disociación del r-det de R1-19 ó de R100 por recombinación de las IS1 es distinta en diferentes géneros de enterobacterias. En E. coli la frecuencia es muy baja (67), aunque se incrementa en cepas hiperrecombinantes (38) o en el caso de plásmidos mutantes (29). En S. typhimurium, la frecuencia de recombinación de las IS1 de estos plásmidos es muy elevada, por lo que son inestables en esta bacteria, ya que se disocian rápidamente en RTF y r-det (91). Se han aislado mutantes de S. typhimurium en las cuales la frecuencia de recombinación de la IS1 se reduce unas 100 veces; la mutación no está localizada en el locus rec A y no tiene efecto sobre la recombinación (95).

En Proteus mirabilis, el R100 también es inestable. En esta bacteria la región r-det se amplifica a baja frecuencia. Cuando se cultiva P. mirabilis en presencia de concentraciones elevadas de Cm, se seleccionan células que tienen amplificada selectivamente la región r-det, que es donde se localiza el gene de resistencia a Cm. En este caso, la región amplificada en tandem puede estar unida a una copia del RTF o bien encontrarse como monómero o múltiplo disociado (42).

Como se puede ver, la disociación del r-det depende tanto de fac

tores del plásmido como de factores propios del huésped.

Las bacterias donde la inestabilidad del R100 es mayor, son aquellas en las que no se ha reportado la presencia de IS1 en su cromosoma: S. typhimurium y P. mirabilis; mientras que en E. coli donde sí se ha reportado la presencia de IS1 en el cromosoma, el plásmido es más estable. Esto podría hablar de una cierta influencia entre las IS1 localizadas en el cromosoma y las presentes en los plásmidos.

Podemos decir que la IS1 provee un alto grado de movilidad para los genes de resistencia a antibióticos de los plásmidos tipo R, lo cual contribuye a su rápida diseminación.

De igual manera, debido a la presencia de múltiples copias de esta secuencia en el cromosoma de ciertas bacterias, se puede esperar que provean de una gran movilidad al genoma, proporcionando la diseminación de una gran cantidad de genes para la adaptación y evolución bacteriana.

Como ya se mencionó, la IS1 también se ha detectado en fagos, como el caso de P1 que porta una copia del elemento (45). Las dos terceras partes de las mutaciones de P1 son debidas a deleciones; todas las deleciones empiezan donde se encuentra situada la IS1 (3). Se puede tener transducción especializada de segmentos cromosomales flanqueados por do IS1, al integrarse dentro de la IS1 de P1 (48).

Al igual que todos los EGM, la IS1 produce una serie de eventos característicos. Al insertarse, produce mutaciones por inserción y mutaciones polares fuertes, como por ejemplo en los operones gal y lac de E. coli (90).

La integración de IS1 confiere inestabilidad genética en la región de inserción produciéndose deleciones con alta frecuencia (79). Pero no únicamente la inserción de IS1 causa inactivación de genes, también puede activar genes, como es el caso del operón críptico bgl

(81). IS1 también induce deleciones de los segmentos que quedan en medio de dos copias que se encuentran en sentido directo; si las copias de IS1 se encuentran en sentido inverso, se produce una inversión del segmento intermedio (85).

La transposición de la IS1 genera una duplicación en el punto de inserción del DNA blanco. La longitud de la duplicación es de 9 pb, que quedan como secuencias repetidas directas flanqueando la IS1 (39). En cuanto al sitio de inserción de la IS1 se ha visto que son preferentemente regiones ricas en residuos A-T. La presencia de secuencias homólogas a los extremos de la IS1 también pueden estimular la integración (19).

Se ha demostrado que las mutaciones por deleción o inserción en los extremos de IS1 hacen que pierda la habilidad para transponer; si se muta dentro de la IS1, únicamente se reduce la frecuencia de transposición. Las mutaciones de los extremos (secuencias repetidas invertidas) pueden ser coplementadas por una IS1 normal portada en el mismo replicón. Los resultados experimentales sugieren que los factores que produce la IS1 actuan principalmente en cis (58).

Esto hace que debido a la presencia de IS1 en el cromosoma de E. coli, el análisis de su comportamiento, organización y expresión de genes se complique debido a que se pueden tener factores que actuen en trans y modifiquen los eventos estudiados. Se han detectado para el Tn3, Tn5 y Tn10 moléculas represoras que actuan en trans (7,10,29).

La frecuencia de transposición de la IS1 en E. coli es de aproximadamente  $10^{-7}$  (eventos/células). Los experimentos para medir la frecuencia de transposición se basan principalmente en la detección de formación de cointegrados; este es el evento que se puede medir con mayor facilidad ya que la IS1 no tiene marcadores que puedan seleccionarse facilmente (25,73).

Los cointegrados formados por la IS1 son más estables que los formados por otros EGM (36), lo que ha hecho pensar que estas moléculas no son intermediarios de la transposición de este elemento, sino un producto de ella. En el caso de IS1 se tiene por lo tanto dos productos principales de transposición: inserción simple y cointegrados.

La transposición de IS1 es, al igual que en los demás EGM, independiente de los procesos de recombinación homóloga de la bacteria. La frecuencia de transposición no se altera si el evento se lleva a cabo en células rec A<sup>-</sup> o rec BC<sup>-</sup> sbc B<sup>-</sup>. Tampoco se afecta si la célula huésped contiene una mutación en el gene de la DNA polimerasa I (pol A1) (74). La transposición, sin embargo, sí se modifica en células con mutaciones en los genes ger A (rearrreglos genómicos); hip (proteína de integración del huésped); tnm (migración de Tn) y top (topoisomerasa I). Todos estos genes disminuyen la frecuencia de transposición de la IS1 (48).

Todo segmento de DNA flanqueado por dos IS1 es potencialmente un transposón. A nivel de laboratorio se han podido crear transposones de novo, utilizando la IS1 (46,73).

La IS1 da origen a un importante grupo de transposones compuestos. Dentro de estos se tiene al Tn9, con una longitud de 2638 pb, que contiene una región de 1102 pb flanqueada por dos copias de IS1 en orientación directa. Esta región central codifica al gene cat, el cual induce resistencia a cloramfenicol (1,80). Funcionalmente es igual a una IS1, se inserta duplicando 9 pb en el sitio blanco (50), promueve deleciones e inversiones, tiene excisión precisa en ausencia de rec A (82), e induce la formación de cointegrados aunque de manera menos eficiente que la IS1 (26).

Se ha demostrado que las dos IS1 que flanquean al Tn9 no son funcionalmente equivalentes. La IS1 del lado izquierdo (IS1-L) es 10 ve-

ces más activa que la IS1 del lado derecho (IS1-R). Esta diferencia de actividad no se debe a mutaciones o cambios en la secuencia de las IS1, sino a la secuencia de nucleótidos que rodean a los dos elementos. Si la IS1 está próxima a un sitio donde se lleva a cabo la transcripción y ésta se dirige sobre sus extremos, continuándose a través de ellos, se produce una inhibición de la transposición. El bloqueo de esta transcripción, ya sea por delección del promotor o por inserción de un terminador fuerte de la transcripción, ocasiona que la IS1 recobre su actividad original de transposición (12,59).

El Tn9 también puede llevar a cabo la transposición inversa. Cuando un replicón adquiere un transposón flanqueado por IS, se tiene en realidad dos transposones, ya que ambos segmentos quedan flanqueados por las IS y tienen la capacidad de transponer; si el que transpone es el replicón flanqueado por las IS en lugar de los genes del transposón, se tiene la transposición inversa (80,83). El evento también es regulado por la inhibición transcripcional.

La frecuencia de transposición de transposones flanqueados por IS1, también se ve afectado por el tamaño del elemento, la frecuencia disminuye a la mitad por cada aumento de 1 Kb (25).

El mecanismo de transposición de la IS1 no ha podido ser elucidado completamente, debido a que genera como productos finales de la transposición, tanto cointegrados como inserción simple; este cointegrado no funciona como un intermediario del evento. Por esto, el mecanismo de transposición de IS1 no puede ser explicado por ninguno de los dos modelos más generales: el modelo replicativo que implica la replicación del elemento durante el evento, explicaría la formación de cointegrados pero no la inserción simple; mientras que el modelo conservativo, que no implica la replicación del elemento durante el proceso, explica la inserción simple pero no la formación de cointegrados.

Para explicar como la transposición de IS<sub>1</sub> puede generar ambos productos, se propuso que la transposición está invariablemente ligada a replicación en forma de círculo rodante del elemento (35). Un modelo equivalente se propuso para Mu (41).

Sin embargo, existen reportes que sugieren que la inserción simple de IS<sub>1</sub> no sigue el modelo del círculo rodante (11). Por lo que la transposición de IS<sub>1</sub> podría ser, aunque no necesariamente, replicativa.

Se ha propuesto un modelo (Fig. 1), donde ambos productos pueden formarse a partir de un sólo intermediario. Si a partir de ese intermediario se tiene replicación, se forma el cointegrado, si no la hay, se tiene inserción simple (11,27).

En este modelo, la transposición se inicia por la unión de la transposasa a ambos extremos del elemento, el corte de una o ambas hebras de las uniones elemento-vector y la unión a los extremos cortados del DNA blanco. El rompimiento de una sola hebra deja un par de horquillas de replicación y se forma un cointegrado. El rompimiento de las dos hebras separa al vector, y al elemento y no permite la formación de horquillas de replicación, dando por resultado inserción simple. La estructura del producto de transposición esta determinada en el paso inicial, no en la terminación.

Un modelo similar es propuesto para Mu (32). En este caso ya se ha aislado la molécula intermediaria. Para la eficiente formación de ésta, se requiere de la transposasa de Mu (Mu A), la proteína Mu B, que aumenta la eficiencia de replicación, proteínas de la célula huésped, ATP y cationes divalentes. El paso del intermediario hacia cointegrado o inserción simple, depende únicamente de proteínas del huésped. Un aumento en la eficiencia de iniciación de la replicación favorece la cointegración, mientras que una inhibición de la replica-

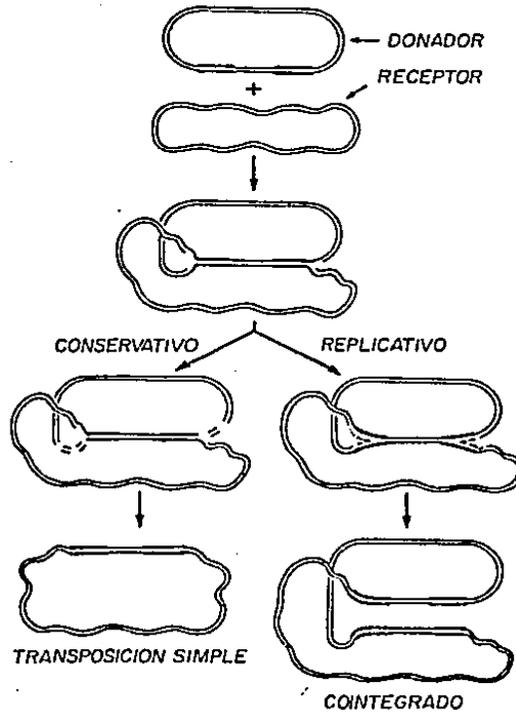


Figura 1.- Modelo de transposición de IS<sub>1</sub>, en el cual se tiene un intermediario con la posterior resolución hacia transposición simple o cointegrados. (Adaptado de la Ref. 11).

ción favorece la inserción simple. Por lo tanto el mecanismo de transposición implica dos fases, en la primera parte se tiene la formación de un intermediario donde la transposasa es responsable de este evento y además influye en el ensamble del complejo de replicación en las horquillas del intermediario. Una actividad secundaria de la transposasa debe ser el determinar la vía que seguirá el intermediario durante la segunda etapa, ya sea producir cointegrados o inserción simple, esta segunda etapa al parecer depende más de los factores de la célula huésped (32).

Como se puede ver, la IS1 es un elemento con una actividad biológica muy importante, pero de la cual todavía se desconocen muchas cosas y se tienen muchas interrogantes como es el caso de su distribución heterogénea dentro de las enterobacterias, lo que plantea problemas en cuanto al origen y evolución del elemento, así como de su capacidad de transposición.

Aunado a esto, está el hecho de que se tienen géneros de enterobacterias que tienen un gran número de copias en el cromosoma, tal es el caso de la Shigella, donde la formación de nuevos transposones pudiera llevarse a cabo a frecuencias relativamente elevadas, principalmente si se cuenta con vectores suficientes para estos nuevos transposones, lo cual es muy factible en este caso, por la gran cantidad de plásmidos crípticos que portan las Shigellas (33).

Otro fenómeno interesante son los rearrreglos que sufre el r-det del R100 en las diferentes enterobacterias, hecho que podría estar influenciado por la presencia o ausencia de IS1 en el cromosoma del huésped. Esto último podría extrapolarse a todos los eventos que lleva a cabo la IS1.

Estas interrogantes, podrían ser contestadas si se hace una buena localización y cuantificación de la IS1 en diferentes enterobacterias

y una comparación de los eventos mediados por IS1 en el cromosoma del huésped, con una diferencia en el número de copias en el cromosoma.

La Hipótesis a comprobar es la siguiente:

Las secuencias de IS1 presentes en el cromosoma bacteriano influyen en su propia regulación y en las de otras IS1 extracromosomales, debido a la producción de factores difusibles que inducen o reprimen genes.

Para comprobarla se fijaron los siguientes objetivos:

1) Localización (cromosoma/plásmidos) de la IS1 en varias cepas de Sh. sonnei, Sh. flexneri y S. typhimurium.

De esta manera se podrá contar con un panorama, de la facilidad con la cual, las IS1 del cromosoma se movilizan a los plásmidos, causando la diseminación de genes cromosomales. Además ya que se necesita cuantificar la IS1 del cromosoma, es necesario evitar la utilización de bacterias que contengan plásmidos con IS1, para evitar errores. Por otro lado, es necesario contar con células huésped que no contengan plásmidos con IS1, para poder estudiar los eventos mediados por la IS1.

2) Cuantificación de la IS1 en el cromosoma de E. coli, Sh. sonnei y S. typhimurium.

Se necesita contar con valores confiables del número de copias de IS1 en cromosoma, si se quiere llevar a cabo un experimento donde se va a estudiar su comportamiento en cepas con diferente número de copias. Además, se podrá detectar la distribución de la IS1 en cepas clínicas aisladas en la Cd. de México y comparar con el patrón obtenido en otros países y ver si esta distribución es de carácter general.

3) Obtención de una cepa de Sh. sonnei libre de plásmidos.

Esto es con el fin de estudiar los eventos mediados por IS1 sin

la posible interferencia de otros factores. Cepas de E. coli y S. typhimurium sin plásmidos se encuentran de manera natural.

4) Estudiar la recombinación de las IS<sub>1</sub> del plásmido R100, bajo la presión de diferente número de copias de IS<sub>1</sub> en el cromosoma de la célula huésped.

Se podrá determinar hasta que grado los rearrreglos del r-det están sujetos a la presencia de IS<sub>1</sub> en la célula huésped.

5) Cuantificar la frecuencia de varios eventos mediados por IS<sub>1</sub>: inserción simple, formación de cointegrados y transposición inversa, en células huésped con diferente número de IS<sub>1</sub> en cromosoma.

Con esto se tendrá una idea clara de alguna posible actividad en trans de la IS<sub>1</sub> y de que manera se ven afectados los eventos que promueve.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Cepas, fagos, plásmidos y transposones.

Las cepas, fagos, plásmidos y transposones utilizados en este trabajo se enlistan en la Tabla 1.

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio líquido de Luria (56) o medio sólido de Luria (caldo Luria, agar 2%). En las ocasiones requeridas, a este medio se le agregaron los siguientes antibióticos: ampicilina (Ap) 200  $\mu\text{g/ml}$ ; cloramfenicol (Cm) 25  $\mu\text{g/ml}$ ; espectinomycinina (Sp) 25  $\mu\text{g/ml}$ ; estreptomycinina (Sm) 200  $\mu\text{g/ml}$ ; kanamicina (Km) 25  $\mu\text{g/ml}$ ; ac. nalidíxico (Nal) 25  $\mu\text{g/ml}$ ; tetraciclina (Tc) 5, 10 ó 25  $\mu\text{g/ml}$  y sulfametoxol (Su) 200  $\mu\text{g/ml}$ .

### 2. Sensibilidad celular a Metil Metano Sulfonato (MMS).

Las células se crecieron en caldo de Luria hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm (D.O. 550 nm) de 0.05; se inoculó 0.1 ml de este cultivo en 1 ml de caldo de Luria con 0.04% de MMS y se incubó 8 hrs. a 37°C con agitación moderada. Bajo estas condiciones experimentales las cepas silvestres crecen, mientras las mutantes polA1 no lo hacen.

### 3. Sensibilidad celular a Nitrofurantoina.

La sensibilidad a nitrofurantoina se determinó por el método descrito por Jenkins y Bennett (49). Las cepas a probar se sembraron en cajas de medio de Luria con 5  $\mu\text{g/ml}$  de nitrofurantoina. En estas cajas las cepas recA<sup>-</sup> no sobreviven.

### 4. Conjugación bacteriana.

Las cepas donadoras y receptoras se crecieron hasta la fase exponencial (0.5 de D.O. 550nm), posteriormente se mezclaron los cultivos en una relación 1:5 ó 10 (donadora/receptora) como descri-

Tabla 1.- Cepas, plásmidos y fagos utilizados en este trabajo.

Cepa, plásmido o fago	Genotipo o fenotipo relevante	Origen
W3110	F- Protótrofa	<u>E. coli</u> Genetic Stock Center (CGSC # 4474)
W3111	Igual a W3110 pero <u>Nal<sup>r</sup></u> y <u>polA1</u>	A. Covarrubias
W3112	Igual a W3111 pero <u>glnG74::Tn5</u>	Este trabajo
GM31	F <sup>-</sup> <u>dcm-6</u>	M. Marinus
MX902	<u>thi<sup>-</sup></u> <u>ilv<sup>-</sup></u> $\Delta$ ( <u>pro-lac</u> ) <u>glnG74::Tn5</u>	F. Bastarrachea
C600	<u>thi<sup>-</sup></u> <u>leu<sup>-</sup></u> <u>lac<sup>-</sup></u>	C. Miller
C700	Igual a C600 pero <u>Nal<sup>r</sup></u> <u>Sm<sup>r</sup></u>	Este trabajo
CA13	<u>lac</u> amb <u>trp</u> amb <u>SuIII<sup>-</sup></u>	C. Gómez
CA13·1	<u>lac</u> amb <u>trp</u> amb <u>SuIII<sup>+</sup></u>	C. Gómez
MA766	Hfrk9 <u>hisG9424::Tn10</u> <u>recA1</u>	M. Faalen
Su694	<u>trpA52</u> <u>cysB12</u> <u>pyrF140</u> <u>ilvA178</u> LT2	G. Alfaro
Su696	Igual a Su694 pero <u>Nal<sup>r</sup></u>	C. Gómez
Su796	Igual a Su696 pero <u>Sm<sup>r</sup></u>	Este trabajo
Su896	Igual a Su796 pero <u>recA1</u>	Este trabajo
MSS211	Igual a MSS21 (Tabla 2) pero <u>Sp<sup>S</sup></u> <u>Su<sup>S</sup></u>	Este trabajo
MSH101	Igual a MSH10 (Tabla 2) pero <u>Tc<sup>S</sup></u> <u>Sm<sup>S</sup></u> <u>Su<sup>S</sup></u>	Este trabajo
MSH102	Igual a MSH101 pero <u>polA1</u> <u>glnG74::Tn5</u>	Este trabajo
MSH103	Igual a MSH101 pero <u>Nal<sup>r</sup></u> <u>Sm<sup>r</sup></u>	Este trabajo
MSH104	Igual a MSH102 pero <u>Nal<sup>r</sup></u> <u>Sm<sup>r</sup></u>	Este trabajo
pOX38Km	Derivado de F al que se le deletaron todas las IS, <u>Km<sup>r</sup></u>	D. Galas
pBR322	<u>Ap<sup>r</sup></u> <u>Tc<sup>r</sup></u>	F. Bolívar
pBR322::IS1	Igual a pBR322 pero con <u>IS1</u>	M. Chandler
pBR322::Tn9	Igual a pBR322 pero con <u>Tn9</u> ( <u>Cm<sup>r</sup></u> )	D. Galas
R100	<u>Mer<sup>r</sup></u> <u>Su<sup>r</sup></u> <u>Sm<sup>r</sup></u> <u>Sp<sup>r</sup></u> <u>Cm<sup>r</sup></u> <u>Tc<sup>r</sup></u>	G. Alfaro

Tabla 1.- Continuación

Cepa, plásmido o fago	Genotipo o fenotipo relevante	Origen
pRTF-2	Derivado del R1-19, al que se le deletó el r-det, que porta Tn $\underline{5}$ (Km $^r$ ) y Tn $\underline{10}$ (Tc $^r$ )	C. Gómez
pDS1109	ColE1::Tn $\underline{1}$ (Ap $^r$ )	D. Sherratt
RP4::SuA1P2 $^+$		
$\beta$ 1G $\beta$ 2	<u>sup</u> III Km $^r$ Ap $^r$ Tc $^r$ amb	M. Faelen
pLM2	Km $^r$ Ap $^r$ amb Tc $^r$ amb	L. Mindich
T4	Fago silvestre	N. Willetts
T4 amN50	Gene mutado 20 (ambar). Morfogénesis de la cabeza. Formación de policabezas.	N. Willetts
T4 amN58	Gene mutado 34 (ambar). Componentes de las fibras de la cola.	N. Willetts
P1	<u>vir a</u>	N. Willetts

de Miller, H. (63). Las mezclas se incubaron a 37°C de 8 a 12 hrs. y se sembraron en medios selectivos.

#### 5. Propagación y titulación de fagos.

Para propagar y titular los diferentes fagos utilizados en este trabajo se siguieron los métodos descritos por Miller, H. (63) y Willetts, N. (97), con algunas modificaciones.

##### a) Propagación y titulación de P1 vir a.

La cepa donde se propagó el fago P1 se creció en Luria a 0.25 de D.O. a 550nm, se añadió  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de  $5 \times 10^{-3}$  M y se incubó el cultivo a 37°C por 10 min. Posteriormente se mezclaron 1 ml de cultivo y 0.1 ml de fago ( $10^7 - 10^8$  unidades formadoras de placas/ml (ufp/ml)) en agar blando LC (caldo de Luria, agar al 0.7% y  $\text{CaCl}_2$  0.25 M) y se sembró por vaciado en cajas LC (caldo de Luria, agar al 2% y  $\text{CaCl}_2$  0.25 M). Las cajas se incubaron toda la noche a 37°C después de lo cual, se agregaron 3 ml de caldo de Luria sobre las cajas LC. Las cajas se incubaron 1 - 2 hrs. en frío y finalmente se cosechó el fago colectando el caldo de Luria y la capa de agar blando.

Para titular el fago P1, la cepa bacteriana sensible se creció en 10 ml de caldo de Luria a 0.2 de D.O. a 550nm. El cultivo se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.015 M y  $\text{MgSO}_4$  0.03 M. Se mezclaron 0.1 ml del cultivo concentrado de bacterias, 0.1 ml de diferentes diluciones del fago y 2.5 ml de agar blando LC y se sembró por vaciado en cajas LC.

##### b) Propagación y titulación de T4.

La cepa bacteriana se creció en 10 ml de caldo de Luria hasta su fase exponencial. A este cultivo se le añadió una placa lítica de T4 que se recortó y aisló de una caja previa de titula-

ción y se incubó toda la noche a 37°C. Para su titulación se mezclaron 0.1 ml de la cepa bacteriana sensible a 0.2 de D.O. a 550nm, 0.05 ml de diferentes diluciones del fago y 2.5 ml de agar blando y se sembraron por vaciado.

#### 6. Transducción.

La transducción con P1 se realizó según el método descrito por Willetts, N. (97). La cepa bacteriana se creció a 0.3 de D.O. a 550nm, el cultivo se centrifugó y resuspendió en triptona al 1% de manera de tener  $5 \times 10^7$  ufp/ml. Se mezclaron volúmenes iguales de bacterias, fago y solución de  $\text{CaCl}_2$  0.015 M,  $\text{MgSO}_4$  0.03 M y se incubó 20 min. a 37°C sin agitación; después, la mezcla se centrifugó y la pastilla se resuspendió en medio de dilución ( $\text{MgSO}_4$  0.25 %). Finalmente, se sembraron diferentes diluciones en los medios de selección.

#### 7. Determinación de producción de Colicinas.

Las cepas se sembraron en Luria sólido por piquete y las cajas se incubaron toda la noche a 37°C. La caja destapada e invertida se colocó sobre papel filtro humedecido con cloroformo por media hora, después se incubó a 37°C por 15 min. Sobre estas cajas se sembró 0.1 ml de un cultivo de una cepa sensible a colicinas.

#### 8. Curación de plásmidos bacterianos.

Para la curación de plásmidos se utilizaron varios compuestos: bromuro de etidio, naranja de acridina, rifampicina, novobiocina y trimetoprima. Todos estos compuestos a dosis subletales son capaces de eliminar plásmidos de sus células huésped (5, 6, 14, 65, 98)

Para determinar las dosis subletales, las cepas a tratar se crecieron en caldo de Luria con diferentes concentraciones de esos

compuestos. Las dosis subletales fueron, para bromuro de etidio: 125  $\mu\text{g/ml}$ ; naranja de acridina: 100  $\mu\text{g/ml}$ ; rifampicina: 4.5  $\mu\text{g/ml}$ ; novobiocina: 250  $\mu\text{g/ml}$  y trimetoprima: 30  $\mu\text{g/ml}$ .

El experimento de curación se realizó incubando aproximadamente mil células en medio de Luria con el compuesto correspondiente, a una concentración equivalente a la dosis subletal. El cultivo se incubó a 37°C con agitación por 18 horas y se sembró en Luria sólido. Para determinar la posible curación de los plásmidos, se sembraron en Luria sólido por parchado, 100 colonias y se replicaron en medios con los antibióticos correspondientes a los marcadores de resistencia de los plásmidos que se deseaba curar.

#### 9. Estabilidad de plásmidos.

El experimento se inició con mil células aproximadamente, que se crecieron en caldo de Luria a 37°C con agitación moderada, manteniéndose en fase exponencial mediante diluciones periódicas. En cada dilución, se realizó una cuenta viable y cada veinticuatro horas se sembraron 100 colonias en medio de Luria por parchado y se replicaron en medios con los antibióticos correspondientes para determinar la estabilidad del plásmido en estudio.

#### 10. Transformación.

Se siguió el método de transformación con cloruro de calcio descrito por Maniatis, T. y col. (61).

#### 11. Lisados claros.

La extracción del DNA de las bacterias, se llevó a cabo mediante el método de lisados claros alcalinos descrito por Maniatis, T. y col. (61). Se incubaron 1.5 ml de cultivo bacteriano, pero también se extrapoló a un volumen de 20 ml de cultivo y las centrifu-

gaciones se realizaron en la centrífuga Sorval RC-5.

#### 12. Obtención del DNA total.

Se siguió el método descrito por Bolivar, F. y col. (13), que es un lisado suave con lisozima y Tritón X-100. Se hizo una modificación al final del método que consistió en una dilución 1:10 del lisado con amortiguador TE (Trizma-base 10 mM y Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, pH 8) y posteriormente una extracción con un volumen de fe nol y otra con un volumen de cloroformo.

#### 13. Purificación de plásmidos.

Para purificar los plásmidos, primero se hizo una lisis celular alcalina con SDS y posteriormente el DNA cromosomal y el de los plásmidos se separaron en gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio (BrEt), según el método descrito por Maniatis, T. y col. (61). El DNA en los tubos de centrifuga se visualizó con luz U.V. y se extrajo por punción lateral; el BrEt se removió por medio de una columna de intercambio iónico (Dowex A 650 W-X8 de Bio-Rad), el DNA se dializó y concentró finalmente por precipitación con etanol.

#### 14. Digestión con enzimas de restricción.

Las reacciones con las enzimas de restricción se llevaron a cabo según las recomendaciones del proveedor (Amersham, Corp.).

#### 15. Electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis se realizó en geles verticales en placas (18 X 14 X 0.15 ó 0.3 cm). Se utilizó agarosa al 1% en amortiguador de acetatos (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, acetato de so-

dió 20 mM, NaCl 18 mM, pH 8.15). La electroforesis se efectuó a voltaje constante de 80 volts por 3 a 4 horas. Los geles se tiñeron en BrEt (10  $\mu$ g/ml), se observaron con luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Voigtländer VF 135 utilizando filtro rojo.

16. Purificación de fragmentos de DNA separados por electroforesis en geles de agarosa (Electroelución).

Después de la electroforesis y visualización del DNA en el gel, se cortó el fragmento de agarosa con el DNA deseado, se colocó en la cámara de electroelución en el compartimiento correspondiente al polo negativo. La cámara se llenó con amortiguador de Boratos (Trizma-base 445 mM, ácido bórico 445 mM, EDTA 10 mM). Se aplicaron 100 V por 1.5 horas, después de lo cual se invirtieron los electrodos por 3 min. Se tomó el amortiguador de la cámara correspondiente al polo positivo y se repitió la operación. El volumen obtenido se pasó a través de resina BND de intercambio iónico, eluyendo el DNA con amortiguador de alta concentración de sal (Trizma-base 1 mM, NaCl 1 mM, etanol 15 ml/100 ml). Finalmente el DNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol.

17. Hibridización DNA-DNA (Southern).

El DNA en el gel de agarosa, se transfirió a filtros de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell); para esto, el gel se trató de la siguiente manera: se incubó 10 min. a 37°C con HCl 0.25 N; 30 min. a 37°C con NaOH 0.5 M, NaCl 1 M; 30 min. a 37°C Con Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M, pH 7.5. Estas incubaciones se hicieron con agitación de 80 rpm. Finalmente el gel se colocó en una solución

de SSC6X. Para la transferencia, se colocó un filtro de nitrocelulosa sobre el gel como describe Maniatis, T. y col. (61).

La prehibridización e hibridización se realizaron como reportaron Grunstein y Hogness (40), utilizando el siguiente amortiguador: formamida (Bio-Rad) 50%, SSC5X, SDS 0.1%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, solución Denhardt 1X y 416  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de esperma de salmón desnaturalizado.

El fragmento de DNA utilizado como monitor se marcó con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  (Amersham, Corp.), mediante el método de "Nick-translation" que describe Maniatis, T. y col. (61).

El amortiguador de hibridización contenía aproximadamente  $10^6$  dpm de monitor marcado y desnaturalizado. Tanto en la prehibridización como en la hibridización, los filtros y amortiguadores se colocaron en bolsas de plástico selladas y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  ó  $42^\circ\text{C}$  por 18 horas. Al terminar la hibridización, los filtros se lavaron con SDS 1%, SSC2X a temperatura ambiente y con SDS 0.1%, SSC 0.1X a  $50^\circ\text{C}$ , por último con SSC 0.1X a temperatura ambiente. Los filtros se secaron a  $70^\circ\text{C}$  por 1 hora. La autorradiografía se llevó a cabo exponiendo placas para rayos X Kodak X-Omat K a los filtros por 1 ó 2 días.

#### 18. Hibridización en punto DNA-DNA.

Se siguió el método descrito por Kafatos, F. y col. (52). Para hacer la hibridización, se purificó el DNA total de las células y a partir de una solución que contenía 1  $\mu\text{g}$  de DNA se hicieron diluciones sucesivas 1:1 hasta una dilución 1:64. El DNA se cuantificó de manera aproximada observando su fluorescencia en un gel de agarosa teñido con BrEt y las diluciones se hicieron con

acetato de amonio 1 M. Se colocó un volumen máximo de 10  $\mu$ l por muestra. La prehibridización, hibridización, lavado y autorradiografía del filtro se realizó igual a lo descrito anteriormente para la hibridización de DNA-DNA tipo Southern.

19. Obtención del monitor radioactivo para rastreo de la secuencia IS<sub>1</sub>.

El monitor que se utilizó fue un fragmento de 578 pb de la parte intermedia de la IS<sub>1</sub>, del sitio PvuII localizado en el nucleótido 75 al sitio EcoRII de la posición 653 (Fig. 2).

El fragmento se obtuvo a partir del plásmido pBR322::IS<sub>1</sub>, el cual se extrajo por lisis alcalina de la cepa GM31 y se purificó mediante gradientes de cloruro de cesio. El plásmido puro se digirió con la enzima de restricción EcoRII obteniéndose siete fragmentos (Fig. 2). El fragmento G, que contiene a la IS<sub>1</sub> se aisló a partir de un gel preparativo de agarosa al 1% (18 X 14 X 0.3 cm) por electroelución. Posteriormente, el fragmento se digirió con la enzima PvuII, lo cual produjo el fragmento de 578 pb de la IS<sub>1</sub> que también se extrajo de un gel preparativo de agarosa por electroelución. Se realizaron 3 ciclos de electroforesis-electroelución, después de cada digestión enzimática, para asegurar la pureza del fragmento. El fragmento de la IS<sub>1</sub> se marcó radioactivamente con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP por el método de "Nick translation" (61).

20. Determinación de la frecuencia de transposición.

Se utilizó el método descrito por Chandler, M. y Galas, D. (27). Este método se basa en la detección de cointegrados mediante conjugación. El plásmido donador de la secuencia de inserción fue el pBR322::IS<sub>1</sub> ó el pBR322::Tn<sub>9</sub>, mientras que el plásmido receptor

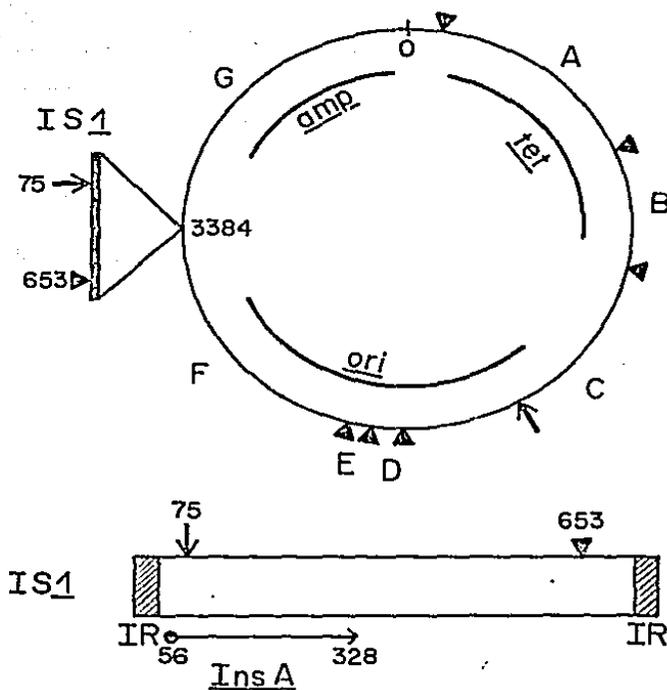


Figura 2.- Mapa de restricción del plásmido pBR322::IS<sub>1</sub>, que muestra la localización de la secuencia IS<sub>1</sub> y el fragmento de ésta utilizado como monitor en los diferentes experimentos realizados. Sitios de *EcoRII* (▽); sitios de *PvuII* (↓); *amp* gene de β-lactamasa; *tet* gene de resistencia a Tc; *ori* origen de replicación. Las letras A a G indican los fragmentos que se obtienen después de cortar con *EcoRII*. IR, secuencias invertidas repetidas. *Ins A*, proteína producida por IS<sub>1</sub>.

fue el pOX38Km que es un plásmido conjugativo. Los plásmidos pBR322 se introdujeron por transformación, mientras que el pOX38Km por conjugación en las cepas C600, Su694 y MSH101, que posteriormente actuaron como cepas donadoras. Las cepas receptoras fueron C700, Su796 ó Su896 y MSH103 ó MSH104. Tanto la cepa donadora, como la receptora, se crecieron toda la noche en caldo de Luria a 37°C. Los cultivos se diluyeron 1:100 y se incubaron a 37°C hasta alcanzar 0.9 de D.O. a 550nm. Posteriormente, se mezclaron volúmenes iguales de los cultivos de las cepas donadora y receptora y se incubaron de 12 a 16 horas a 37°C sin agitación. La mezcla se concentró de 10 a 15 veces y se sembró 0.1 ml en el medio de selección. En el caso del pBR322::IS<sub>1</sub> se seleccionó para resistencia a Ap y Tc, mientras que para el pBR322::Tn<sub>9</sub> se seleccionó para estas dos resistencias y además para Cm. La eficiencia de conjugación se calculó dividiendo el número de células/ml con resistencia a Km, Nal y Sm, sobre el total de células/ml.

## R E S U L T A D O S

1. Localización (cromosoma/plásmidos) de la secuencia IS<sub>1</sub> en varias cepas de Sh. sonnei, Sh. flexneri y S. typhimurium.

Para tener una idea de la dinámica molecular de la IS<sub>1</sub>, se estudió su distribución en el cromosoma y en los plásmidos de varias cepas mexicanas de Shigella y Salmonella. Esto ayudará a conocer la facilidad de intercambio de IS<sub>1</sub> entre cromosoma y plásmidos, además, permitirá cuantificar de manera más exacta, el número de IS<sub>1</sub> en el cromosoma.

Por otra parte, el método que se seleccionó para cuantificar la frecuencia de transposición de la IS<sub>1</sub>, requiere que en la bacteria no estén presentes plásmidos con IS<sub>1</sub>, ya que este método consiste en introducir a la bacteria dos plásmidos diseñados específicamente para obtener esta cuantificación y uno de ellos contiene una IS<sub>1</sub> (ver Material y Métodos).

La localización de la secuencia IS<sub>1</sub> se realizó en cepas de Shigella y Salmonella aisladas en Hospitales y Laboratorios de la Cd. de México, durante los años de 1978-1979 (Tabla 2); se utilizaron seis cepas de Sh. sonnei, cinco de Sh. flexneri y tres de S. typhimurium. Todas las cepas fueron resistentes a más de un antibiótico, con excepción de una Salmonella (Su696). La resistencia en estas cepas se debe principalmente a la presencia de plásmidos de tamaño similar al de R100 (94.5 Kb) (Figs. 3A, 4A y 5A). Por ejemplo la cepa MSH10 que perdió el plásmido grande mediante curación con bromuro de etidio se volvió sensible a Tc, Sm y Su. Además de estos plásmidos, todas las cepas clínicas analizadas presentaron más de una banda de DNA de bajo peso molecular (Figs. 3A, 4A y 5A). El número de bandas no representa el

Tabla 2.- Cepas de Shigella y Salmonella utilizadas para la localización de la secuencia IS<sub>1</sub>.<sup>a</sup>

Cepa	Género y Especie	Fenotipo	Producción de colicinas <sup>b</sup>
MSH10	<u>Sh. sonnei</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	+
MSH27	<u>Sh. sonnei</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup>	+
MSH30	<u>Sh. sonnei</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup>	+
MSH35	<u>Sh. sonnei</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup>	+
MSH46	<u>Sh. sonnei</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup>	+
MSH59	<u>Sh. sonnei</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup>	+
MSH40	<u>Sh. flexneri</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	+
MSH47	<u>Sh. flexneri</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup>	-
MSH49	<u>Sh. flexneri</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	-
MSH53	<u>Sh. flexneri</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	-
MSH57	<u>Sh. flexneri</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	+
MSS07	<u>S. typhimurium</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup>	+
MSS21	<u>S. typhimurium</u>	Tc <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Su <sup>r</sup>	-
Su696 <sup>c</sup>	<u>S. typhimurium</u>	Nal <sup>r</sup>	-

<sup>a</sup> Cepas aisladas en Hospitales y Laboratorios de la Cd. de México durante los años 1978-1979. Donadas por J. Kupersztch.

<sup>b</sup> Cepas productoras (+), cepas no productoras (-).

<sup>c</sup> Cepa donada por G. Alfaro.

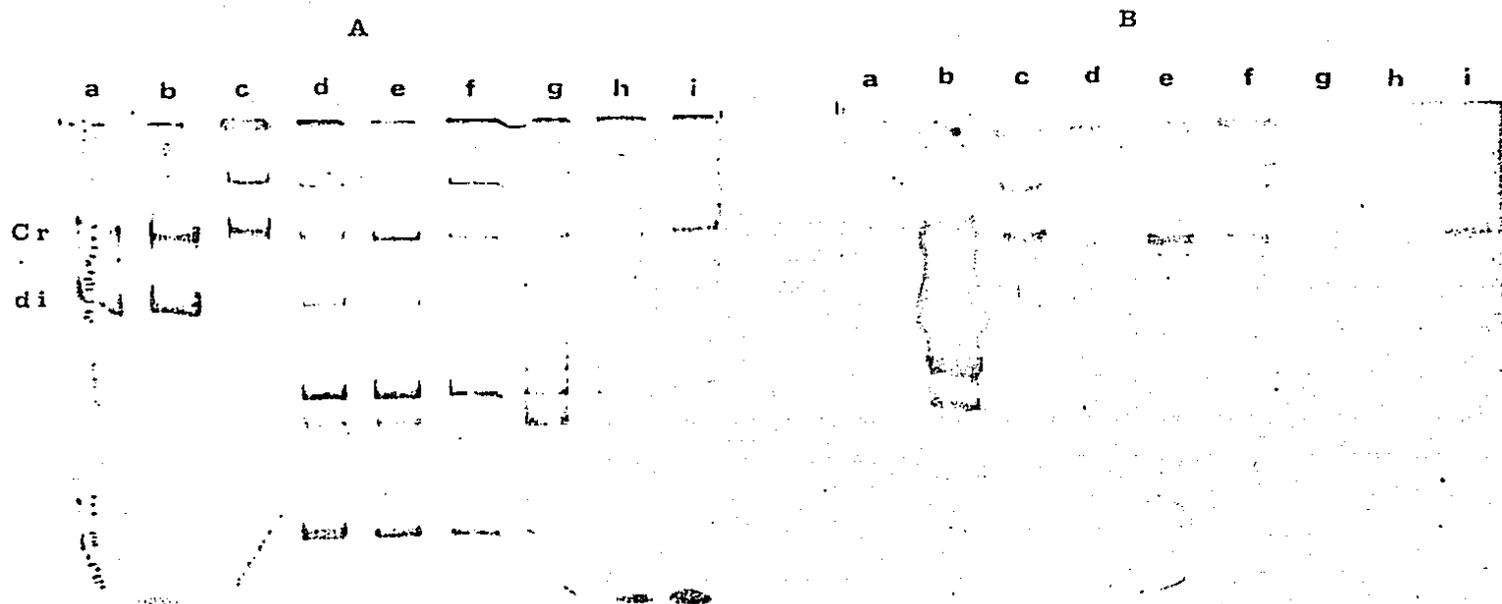


Figura 3.- Localización de la secuencia IS1 en diferentes cepas de Sh. sonnei. A) Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio, que contiene los lisados claros de las siguientes cepas: a) GM31/pBR322; b) GM31/pBR322::IS1; c) W3110/R100; d) MSH10; e) MSH 101; f) MSH101/P1; g) MSH27; h) MSH30; i) MSH35. B) Autorradiografía del filtro de nitrócelulosa obtenido a partir del gel mostrado en (A), después de la hibridización - DNA-DNA tipo Southern con el monitor de IS1 marcado con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ . Cr, banda de cromosoma. di, dímero de pBR322 (5.8 Mdal).

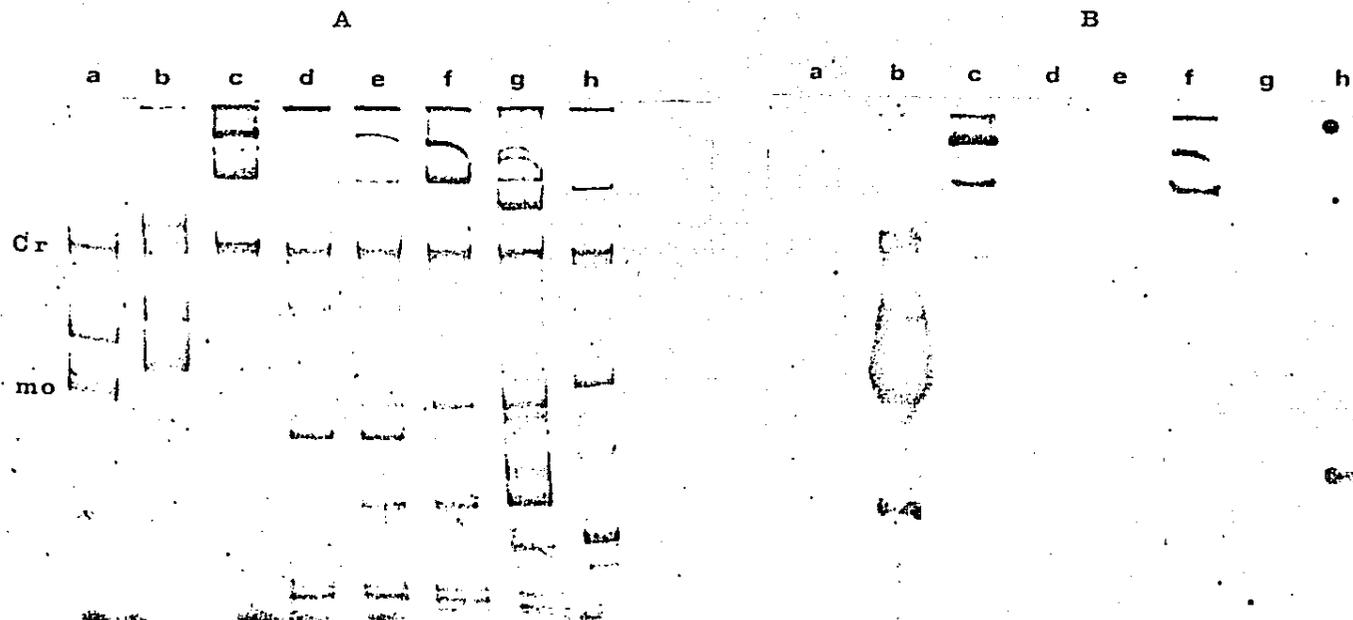


Figura 4.- Localización de la secuencia IS1 en diferentes cepas de Sh. flexneri y Sh. sonnei. A) Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio, que contiene los lisados claros de las siguientes cepas: a) GM31/pBR322; b) GM31/pBR322::IS1; c) W3110/R100; d) MSH35; e) MSH46; f) MSH59; g) MSH40; h) MSH47. B) Autorradiografía del filtro de nitrocelulosa obtenido a partir del gel mostrado en (A), después de la hibridización DNA-DNA tipo Southern con el monitor de IS1 marcado con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ . Cr, banda de cromosoma. mo, monómero de pBR322 (2.9 Mdal).

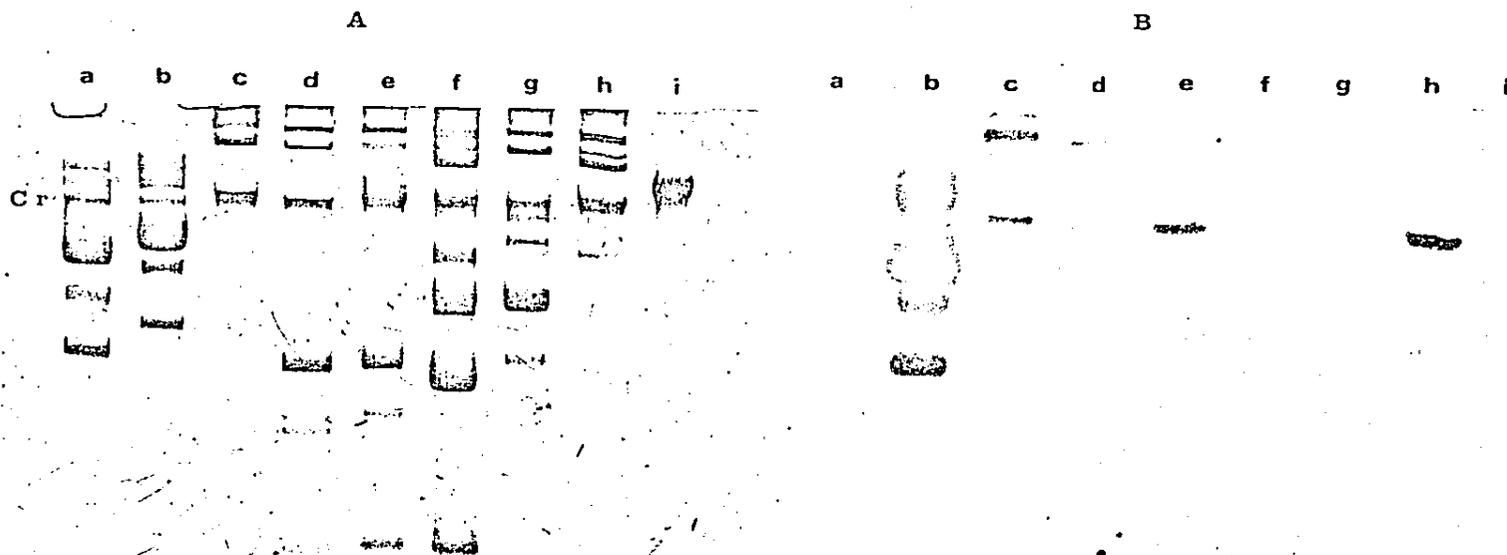


Figura 5.- Localización de la secuencia IS1 en diferentes cepas de Sh. flexneri y S.typhimurium. A) Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio, que contiene los lísados claros de las siguientes cepas: a) GM31/pBR322; b) GM31/pBR322::IS1; c) W3110/R100; d) MSH49; e) MSH53; f) MSH57; g)MSS07; h) MSS21; i) Su696. B) Autorradiografía del filtro de nitrocelulosa obtenido a partir del gel mostrado en (A), después de la hibridación DNA-DNA tipo Southern con el monitor de IS1 marcado con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ . Cr, banda de cromosoma.

número de plásmidos, ya que estos pueden encontrarse no solamente en forma de monómeros, sino también como multímeros (dímeros, trímeros, etc.) y concatámeros.

La localización se llevó a cabo por hibridización DNA-DNA tipo Southern, con el monitor radioactivo para la IS<sub>1</sub>.

En los primeros experimentos, la cepa que se utilizó como control negativo de la hibridización (GM31/pBR322), mostró una señal muy clara en las bandas correspondientes al pBR322, lo mismo sucedió con varias bandas de plásmidos pequeños de las cepas de Shigella. Esto indicaba que el fragmento de IS<sub>1</sub> estaba contaminado con un fragmento de pBR322, ya que el monitor se purificó a partir del pBR322::IS<sub>1</sub>. El fragmento contaminante pudo ser el fragmento C del pBR322 (Fig. 2), que es el que tiene un tamaño similar al fragmento de IS<sub>1</sub>, al ser cortado con las enzimas de restricción. Este fragmento contiene parte del origen de replicación de pBR322, el cual proviene de un plásmido similar al ColE1. Por lo tanto, debe existir homología entre el origen de replicación de ColE1 y los plásmidos pequeños Shigella. Para evitar esta contaminación, el fragmento de IS<sub>1</sub> se purificó mediante tres ciclos de electroforesis-electroelución. Una vez que el control negativo no presentó hibridización con el monitor de IS<sub>1</sub>, se realizaron los experimentos correspondientes.

En las Figuras 3, 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos. Todas las cepas de Shigella mostraron una clara señal de hibridización en la banda de DNA correspondiente al cromosoma (Figs. 3B, 4B y 5B), con excepción de la cepa MSH40 que mostró una señal tenue (Fig. 4B). De las once cepas analizadas, tres contenían también IS<sub>1</sub> en plásmidos grandes (MSH59, MSH49 y MSH53, Figs. 4B y 5B) y una en plásmidos pequeños (MSH47, Fig. 4B).

Con lo que respecta a las cepas de Salmonella analizadas, en la

Figura 5B se puede ver que en las cepas Su696 y MSS07 no se encontró IS1 en cromosoma o en plásmidos como se esperaba. Sin embargo, la cepa MSS21 presentó señal de hibridización con IS1 en el cromosoma. La intensidad de la señal podría corresponder a más de una copia de esta secuencia.

No se puede hacer una generalización en cuanto a la localización de la IS1 en las cepas de Shigella, ya que aunque todas las cepas analizadas tenían IS1 en el cromosoma, sólo algunas las presentaron en plásmidos y de estas fue más frecuente en plásmidos grandes que en pequeños, a pesar de la abundancia de estos en todas las cepas.

En el caso de las Salmonellas, se encontró que la mayoría no tenía IS1 en el cromosoma, como se ha reportado para cepas de este género aisladas en otros países (66,72). Sin embargo, en este trabajo se encontró una cepa de Salmonella con IS1 en cromosoma. Ninguna de las Salmonellas estudiadas tenía IS1 en plásmidos.

## 2. Cuantificación de la secuencia IS1 en el cromosoma de E. coli, Sh. sonnei y S. typhimurium.

La cuantificación de la secuencia IS1 en cromosoma, es un requisito importante para el estudio del comportamiento de una IS1 en presencia de diferentes cantidades de ésta en el cromosoma de la célula huésped.

En el caso de Shigella, a la fecha únicamente se han reportado valores aproximados. Esta cuantificación permitirá además comparar los resultados encontrados para cepas de E. coli, Shigella y Salmonella aisladas en otros países y las aisladas en México.

La cuantificación de IS1 se realizó por el método de hibridización en punto. Para hacer cuantitativo este método, es necesario con-

tar con cepas controles en las cuales se haya cuantificado el número de IS1 por otros métodos. En este trabajo se utilizó la cepa de E. coli W3110, que tiene 7 copias por cromosoma (72).

La ventaja de este método sobre la hibridización tipo Southern es que puede detectar desde una copia hasta un gran número de ellas. En los experimentos tipo Southern, la cuantificación se realiza contando el número de bandas que hibridizan con el monitor de IS1, sin embargo, con frecuencia varias bandas positivas de tamaño similar aparecen como una sola banda, lo que impide una cuantificación exacta del número total de copias.

El número de copias se calculó a partir del número de cuentas por minuto (cpm), presentes en la región del filtro donde hibridizó el monitor de IS1.

Debido a que se cuantificó una serie de bacterias con un rango amplio en el número de copias, que va de cero (Salmonella), a más de 40 (Shigella), fue necesario contar con una serie de controles para una mejor cuantificación.

Como controles se utilizaron las siguientes cepas: 1) Su696, que no tiene IS1; 2) Su696/R100, que tiene tres IS1 en el plásmido R100, este plásmido se encuentra presente en dos copias por célula, por lo que esta cepa tiene alrededor de 6 a 9 copias de IS1/célula; 3) GM31/pBR322::IS1, el plásmido pBR322::IS1 se encuentra de 30 a 40 copias/célula, de manera que esta cepa presenta aproximadamente de 38 a 48 copias, al sumar las copias del cromosoma (~ 8 copias).

La cuantificación de copias de IS1 por célula se realizó en dos cepas de Shigella, una de Sh. sonnei (MSH101) y una Sh. flexneri (MSH40), así como una S. typhimurium (MSS21). La cepa MSH40 se eligió ya que hibridizó poco con el monitor de IS1 (Fig. 4B) y la MSS21 porque mostró señal positiva de hibridización con IS1 (Fig. 5B).

El número encontrado para MSH101, MSH40 y MSS21, representa el número de copias en el cromosoma, ya que a pesar de que estas cepas contenían plásmidos, estos no presentaron IS<sub>1</sub> (Figs. 3B, 4B y 5B)

En la Figura 6, se observa un ejemplo de los experimentos realizados, las diluciones de las muestras de DNA se efectuaron a fin de determinar una sola copia de IS<sub>1</sub>. En esta figura se puede apreciar el número aproximado de copias para cada cepa tomando la intensidad de las diluciones de la cepa W3110 (Fig. 6, carril f) como control. Sin embargo, para una cuantificación más exacta, se obtuvo el número de cpm para cada punto de hibridización de todas las cepas estudiadas. La cuantificación se realizó de tres maneras: por comparación de las diluciones que tuvieran cpm parecidas, comparando el valor de las muestras sin diluir y comparando el valor total de cpm de todos los puntos de cada carril. Los tres valores dieron resultados similares.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. El número de copias en los controles mostraron los resultados esperados; es decir, la cepa Su696 no contiene IS<sub>1</sub> en el cromosoma, esta misma cepa con el plásmido R100 dió un valor de 12.5 copias. Este valor indica que el plásmido R100 se encuentra de tres a cuatro copias por cromosoma, que es el número de plásmidos por célula cuando éstas se encuentran en la fase estacionaria, que fue el momento en que se aisló el DNA.

La cepa GM31/pBR322::IS<sub>1</sub> presentó un valor de 45.3 copias, el cual correlaciona con el número de copias de pBR322 por cromosoma (30-40) (13), y si a este valor se le suman las 6.8 copias que contiene la cepa GM31, se obtiene el valor encontrado.

El número de copias de IS<sub>1</sub> por cromosoma para las cepas de Shigella fue de 56.4 para la MSH101 y de 41.6 para la MSH40.

En cuanto a la cepa MSS21 de S. typhimurium el número de copias encontrado fue de 8.8, que es un valor comparable al de las cepas de

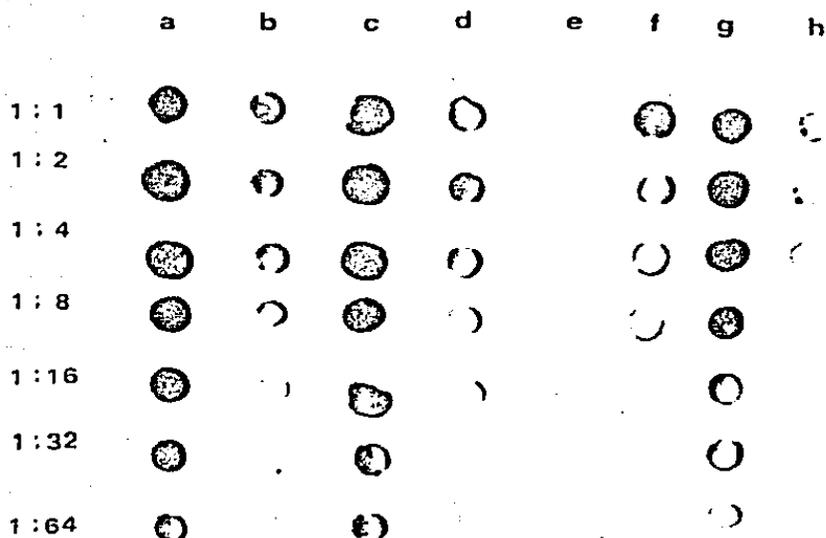


Figura 6.- Determinación del número de copias de la secuencia IS1 en el cromosoma de varias Enterobacterias por Hibridización en punto. Autorradiografía del filtro que contenía las diluciones decrecientes verticales de las diferentes muestras de DNA total, después de la hibridización DNA-DNA en punto, con el monitor de IS1 marcado con  $[\alpha - ^{32}\text{P}] - \text{dCTP}$ . a) MSH40; b) MSS21; c) MSH101; d) - Su696/R100; e) Su696; f) W3110; g) GM31/pBR322::IS1; h) GM31. El primer punto de cada línea contiene  $1 \mu\text{g}$  de DNA.

Tabla 3.- Número de copias de IS1 en el cromosoma de diferentes Enterobacterias.

Cepa	Género y especie	Número de copias de <u>IS1</u> por cromosoma <sup>a</sup>
W3110	<u>E. coli</u>	7.0 <sup>b</sup>
GM31/pBR322::IS1	<u>E. coli</u>	45.3
GM31	<u>E. coli</u>	6.8
Su696	<u>S. typhimurium</u>	0.0
Su696/R100	<u>S. typhimurium</u>	12.5
MSS21	<u>S. typhimurium</u>	8.8
MSH101	<u>Sh. sonnei</u>	56.4
MSH40	<u>Sh. flexneri</u>	41.6

<sup>a</sup> Estos valores se calcularon a partir de las cpm de cada punto de la hibridización DNA-DNA (ver texto) y representan el promedio de cinco experimentos.

<sup>b</sup> El número de copias de IS1 por cromosoma de la cepa W3110, 7 copias (72), fué el utilizado como control.

E. coli, aunque otros autores no han encontrado IS1 en el cromosoma de bacterias de este género (66,72).

Como se puede ver, los tres géneros de enterobacterias estudiados presentan diferencias entre ellos. El género Shigella presenta valores altos, de 40 a 60 copias de IS1 por cromosoma, mientras que E. coli tiene un valor promedio de 7 copias. En cuanto a las cepas del género Salmonella se encontró una cepa que sí contiene IS1 en el cromosoma (8 copias), mientras que el resto como se esperaba, no tienen esta secuencia.

En general el número de copias de las cepas estudiadas, correlaciona con los reportados por otros autores.

### 3. Obtención de una cepa de Sh. sonnei libre de plásmidos.

Para estudiar el comportamiento de la IS1 en diferentes géneros de enterobacterias es preferible contar con cepas sin plásmidos, sin embargo, las Shigellas analizadas presentaron más de un plásmido, principalmente de bajo peso molecular.

Para obtener una Shigella sin plásmidos, se seleccionó la cepa MSH101 que por curación con bromuro de etidio, perdió un plásmido grande, pero aún contenía varios pequeños. Para eliminar estos plásmidos se eligieron tres estrategias experimentales que en E. coli permiten eliminar plásmidos tipo ColE1: A) Introducción de la mutación pol A1: B) Incompatibilidad con plásmidos tipo ColE1 y C) Curación por tratamiento con diferentes compuestos. Estas estrategias se eligieron ya que los plásmidos pequeños de Shigella hibridizaron con DNA del pBR322, cuyo origen de replicación es similar al de ColE1, además la mayoría de las Shigellas fueron productoras de colicinas. Esto permitió suponer que los plásmidos de Shigella podrían ser tipo ColE1.

A) Introducción de la mutación polA1 en MSH101.

La introducción de esta mutación (mutación tipo ambar en el gene de la DNA polimerasa I), en cepas de E. coli que no tienen genes supresores ambar y contienen plásmidos tipo ColE1, induce su curación, ya que la replicación de estos plásmidos depende de la DNA polimerasa I. Por lo tanto, primeramente se estudió si MSH101 tenía genes supresores. Esto se probó introduciendo por conjugación el plásmido pLM2 a la cepa MSH101. Este plásmido confiere resistencia a Ap y Tc únicamente en cepas con supresores ambar. Los resultados mostraron que MSH101 no contenía este tipo de supresores (Tabla 4).

La ausencia de supresores en MSH101 se comprobó también con fagos T4: T4 silvestre, T4 amN50 y T4 amN58. La infección con los fagos N50 y N58 en cepas con supresores, induce la producción de fagos y la lisis bacteriana; en cepas sin supresores la producción de fagos y lisis celular se encuentran muy disminuídos.

Al propagar el fago T4 por primera vez en la cepa MSH101, se obtuvieron títulos bajos en relación a los obtenidos en las cepas de E. coli (Tabla 5). Esto no se esperaba, ya que se ha reportado que los fagos T4 propagados en E. coli, al pasar a Sh. dysenteriae se propagan eficientemente, ya que no actúan sobre ellos los sistemas de modificación-restricción (88). Para aumentar el título, el fago se propagó en la MSH101, Tabla 5, con esto se obtuvo un título alto en Shigella. Sin embargo, los fagos propagados en Shigella, titulan un poco más bajo en E. coli en comparación a cuando son propagados en la propia E. coli.

Para propagar a los fagos N50 y N58 se utilizó la cepa MSH101 pero con RP4::suIII, este plásmido contiene un supresor ambar que permite que estos fagos puedan replicarse.

Los fagos T4, N50 y N58 propagados en Sh. sonnei y con un título

Tabla 4.- Detección de supresores genéticos ambar en la cepa MSH101 de Sh. sonnei utilizando el plásmido pLM2.

Cepa	Resistencia celular a		
	Tc	Ap	Km
CA13/pLM2	- <sup>a</sup>	-	+
CA13-1/pLM2	+	+	+
MSH101/pLM2	-	-	+

<sup>a</sup> Los símbolos + y - indican resistencia y sensibilidad al antibiótico, respectivamente.

Tabla 5.- Titulación del fago T4 en E. coli y Sh. sonnei.

Cepa	Título de T4 (ufp/ml)		
	A	B	C
C600	$2.69 \times 10^{11}$	$1.06 \times 10^9$	$7.48 \times 10^8$
MSH101	$2.18 \times 10^7$	$5.10 \times 10^8$	$1.69 \times 10^8$

(A) T4 propagado en C600; (B) T4 propagado en MSH101;  
(C) T4 propagado por segunda ocasión en MSH101.

elevado se utilizaron para probar supresores en Sh. sonnei. En la Tabla 6, se puede observar que en la cepa MSH101 únicamente se propagó el fago T4, los fagos con mutaciones ambar se propagaron sólo en la cepa con RP4::suIII. En las cepas de E. coli control sucedió lo mismo, los fagos con mutaciones ambar se propagaron más eficientemente cuando la cepa contenía supresores.

Los resultados de los experimentos con pLM2 y con los fagos T4 mostraron que la cepa MSH101 no contenía supresores genéticos tipo ambar, lo que permitió construir la cepa MSH101 polA1 por transducción con el fago P1. Se empezó a partir de la cepa W3111 (polA1); para poder seguir el gene se necesitaba un marcador genético fácil de seleccionar. Para esto se utilizó la cepa MX902 (glnG74::Tn5), ya que los genes gln se encuentran muy cerca del gene polA1 en E. coli y el Tn5 confiere resistencia a Km. Se propagó P1 en la cepa MX902, posteriormente se infectó con estos fagos la cepa W3111 y se seleccionaron las cepas Km<sup>r</sup>. En estas cepas se detectó la mutación polA1 por la prueba de MMS (ver Material y Métodos). De esta manera se obtuvo la cepa W3112 (W3111 polA1 glnG74::Tn5). A partir de esta cepa y con el mismo procedimiento y selección se obtuvo la cepa MSH102 (MSH101 polA1 glnG74::Tn5), Tabla 7. Cabe mencionar que en algunas colonias el fago P1 lisogenizó a la cepa MSH101, Figura 3A, lo que implica que revirtió la mutación vir a de P1, que lo hace un fago lítico.

A pesar de que la prueba de MMS indicó que la cepa MSH102 es una cepa polA1, se realizaron otras pruebas para confirmar esto. Una de ellas, fue introducir por conjugación el plásmido RP4::suIII para revertir la mutación ambar polA1. Sin embargo, no se obtuvieron conjugantes con la cepa MSH102. Esto fue imprevisto ya que el RP4 sí penetró en la cepa MSH101 y en la W3112; en ésta última la mutación polA1 se revirtió con el RP4::suIII (Tabla 7), por lo que la mutación ambar

Tabla 6.- Detección de genes supresores ambar en la cepa MSH101 (Sh. sonnei), con fagos T4.

Cepa	Propagación de		
	T4 <sup>a</sup>	N50	N58
CA13	+ <sup>b</sup>	+	+
CA13-1	+	+	+
MSH101	+	-	-
MSH101/RP4:: <u>suIII</u>	+	+	+

<sup>a</sup> El fago T4 utilizado se propagó en la cepa MSH101 y los fagos ambar N50 y N58 en la MSH101/RP4::suIII antes del experimento.

<sup>b</sup> Los signos + y - indican respectivamente propagación o no de los fagos respectivamente.

Tabla 7.- Caracterización de la cepa MSH102 polA1.

Cepa	Genotipo importante	Resistencia a MMS <sup>a</sup>	Frecuencia de transformación con el plásmido pDS1109 <sup>b</sup> . (cel/ml)
W3110	silvestre	+	$2.75 \times 10^{-5}$
W3111	<u>polA1</u>	-	N.D. <sup>c</sup>
W3112	<u>polA1 glnG74::Tn5</u>	-	0
W3112/RP4:: <u>suIII</u>		+	N.D.
MSH101	silvestre	+	$3.00 \times 10^{-5}$
MSH102	<u>polA1 glnG74::Tn5</u>	-	$1.20 \times 10^{-5}$

<sup>a</sup> Los signos + y - indican si la cepa crece o no en el medio de MMS al 0.4%.

<sup>b</sup> El plásmido pDS1109 es un derivado del ColE1 por lo tanto necesita DNA polimerasa I para su replicación.

<sup>c</sup> No determinado.

polA1 de la que se partió estaba bien.

En otro experimento, se transformaron las cepas polA1 y silvestre con el plásmido pDS1109, que requiere DNA polimerasa I para su replicación. En la Tabla 7, se puede observar que en la cepa de E. coli silvestre hubo transformantes, mientras que en la cepa polA1 no se obtuvieron. En el caso de Shigella se obtuvieron transformantes tanto en la cepa silvestre como en la polA1 aunque en ésta última la eficiencia fue la mitad de la primera.

El que este plásmido se replicara en la cepa MSH102 podría significar que la mutación polA1 no está presente o que se expresa diferente en esta cepa, en comparación con E. coli. Para ver si el fenómeno se debía únicamente a que no habían transcurrido las generaciones suficientes para que la mutación ejerciera su efecto, se estudió la estabilidad del plásmido pDS1109 en MSH102.

La estabilidad del plásmido pDS1109, se midió siguiendo la resistencia a Ap, de células en crecimiento exponencial durante varias generaciones, sin presión selectiva. Como se puede apreciar en la Figura 7, después de 90 generaciones un 36% de las células polA1 habían perdido el plásmido, mientras que en la cepa silvestre el plásmido se mantuvo en un 100% de las células después del mismo número de generaciones. Con esto se comprobó que efectivamente se tenía una cepa de Shigella con la mutación polA1.

La pérdida del plásmido pDS1109, debió verse acompañada con la pérdida de los plásmidos pequeños de Sh. sonnei, si es que su replicación depende de la DNA polimerasa I. Para confirmar esto, a partir de las cepas que se crecieron por 90 generaciones y que perdieron el plásmido pDS1109, se obtuvieron lisados claros para visualizar sus plásmidos por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%.

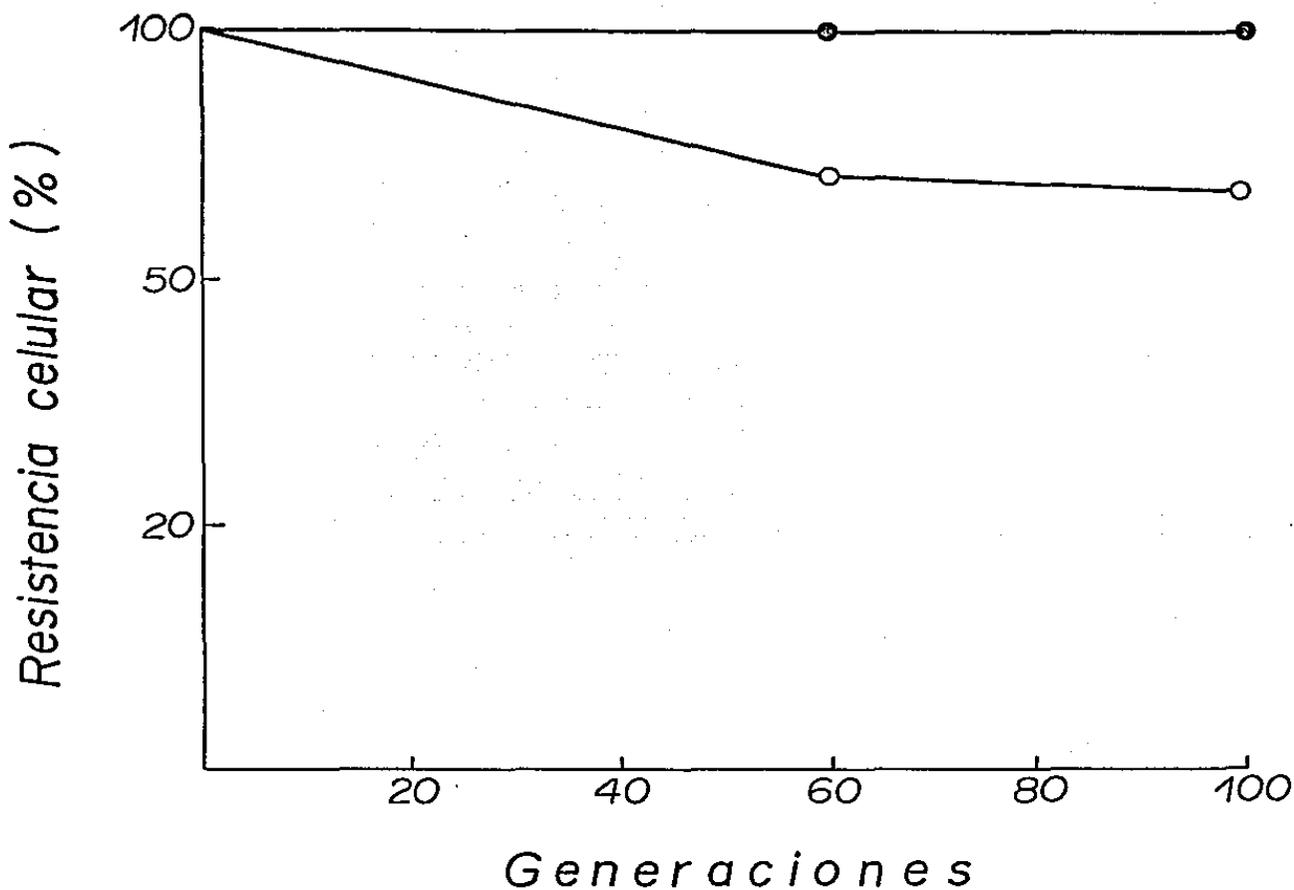


Figura 7.- Estabilidad del plásmido pDS1109 en la cepa MSH102 (Sh. sonnei polA1). La estabilidad se determinó siguiendo la resistencia a Ap. (●) MSH101/pDS1109; (○) MSH102/pDS1109.

En la Figura 8, se puede apreciar en los carriles (d) y (e) la ausencia del plásmido pDS1109 en dos colonias diferentes de la cepa MSH102/pDS1109, después de 90 generaciones; sin embargo, al comparar estos mismos carriles con el carril (a), se ve que todos los plásmidos pequeños siguieron presentes en la Shigella, lo cual indica que los plásmidos pequeños de Sh. sonnei se replican independientemente de la DNA polimerasa I, a diferencia de los plásmidos estudiados en E. coli, que sí necesitan de esta enzima.

#### B) Eliminación de plásmidos por incompatibilidad.

En este caso se transformó la cepa MSH101 con el plásmido pDS1109 y se creció por varias generaciones presionando para este plásmido con Ap. Para seguir el proceso de incompatibilidad se detectó la producción de colicinas. El plásmido pDS1109 es un ColE1 que tiene insertado el Tn1, lo cual ocasiona que no produzca la colicina E1, pero sí confiere inmunidad a ésta. De tal forma que las únicas colicinas detectables son las producidas por los plásmidos de Shigella. Después de 90 generaciones la cepa MSH101/pDS1109 seguía produciendo colicinas, lo cual indicaba que el proceso de incompatibilidad no había funcionado. Para comprobar esto, se hizo un lisado claro de la cepa a las 90 generaciones, la electroforesis del mismo se muestra en la Figura 8, carril (b). Como se puede observar, no se perdió ninguno de los plásmidos de Sh. sonnei, por lo tanto, estos son compatibles con el plásmido pDS1109 a pesar de su posible homología en la región del origen de replicación.

Por otro lado las colicinas producidas por la cepa MSH101, matan por igual a las cepas C600 y a la C600/pDS1109, lo que indica que las colicinas producidas por MSH101 no son del tipo E1 ya que si se trataran de este tipo, la cepa C600/pDS1109 no hubiera muerto debido a

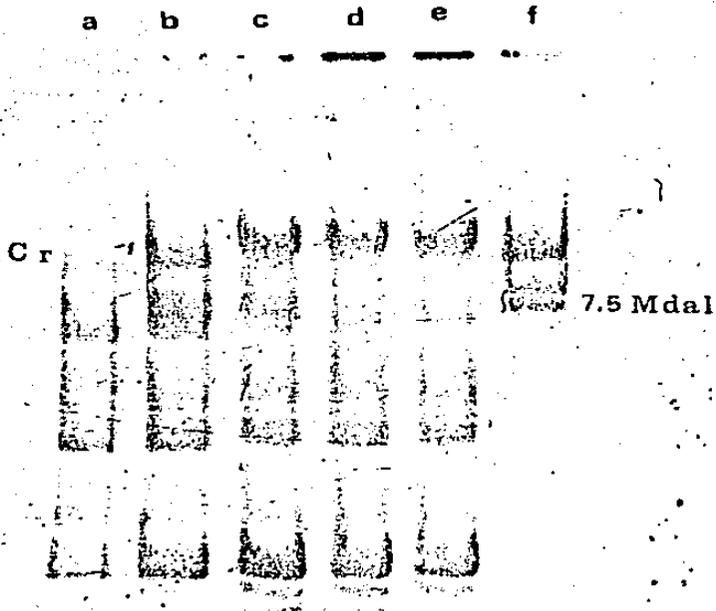


Figura 8.- Comportamiento de los plásmidos pequeños de Sh. sonnei en una cepa polA1. Gel de agarosa al 1% de lisados claros de las siguientes cepas: a) MSH101; b) MSH 101/pDS1109; c), d), e) MSH102/pDS1109; f) C600/pDS1109. Los lisados de las cepas de los carriles b, d y e se obtuvieron después de crecerlas durante 90 generaciones en fase exponencial; los lisados de los carriles a, c y f se obtuvieron de cultivos de toda la noche. Cr, banda de cromosoma.

la inmunidad conferida por el plásmido.

C) Curación de la cepa MSH101 con sustancias químicas y antibióticos.

La curación de la cepa MSH101 se realizó utilizando las dosis subletales de bromuro de etidio, naranja de acridina, rifampicina, novobiocina y trimetoprima, encontradas en el laboratorio para esta cepa. En la figura 9, se puede apreciar el gel de agarosa al 1% con los lisados claros de la cepa MSH101 después de ser tratada con las diferentes sustancias. En ningún caso se tuvo pérdida de alguno de los plásmidos.

También se estudió la producción de colicinas como una prueba de la pérdida de los plásmidos. Únicamente cuando se trató con novobiocina se produjeron alteraciones. La MSH101 produce normalmente halos de inhibición grandes; con el tratamiento de este antibiótico, se produjeron halos pequeños lo que podría indicar la pérdida de un plásmido, pero observando los carriles (f) y (g) de la Figura 9, en comparación con el carril (e), no se observa ninguna diferencia, por lo que no se tiene explicación para ese cambio en el tamaño de los halos.

Después de tratar con estas tres estrategias y no conseguir la eliminación de los plásmidos pequeños de la cepa MSH101, se decidió continuar con la investigación utilizando la cepa como tal, considerando que ninguno de los plásmidos contiene IS<sub>1</sub> como se observó anteriormente (Fig. 3B), por lo que no deberían influir en los experimentos planeados.

Cabe hacer notar la gran diferencia que existe entre los plásmidos pequeños de E. coli y los de Shigella, como es su diferente comportamiento respecto a la DNA polimerasa I, donde los plásmidos Shigella no la necesitan para su replicación; pertenecer a diferentes

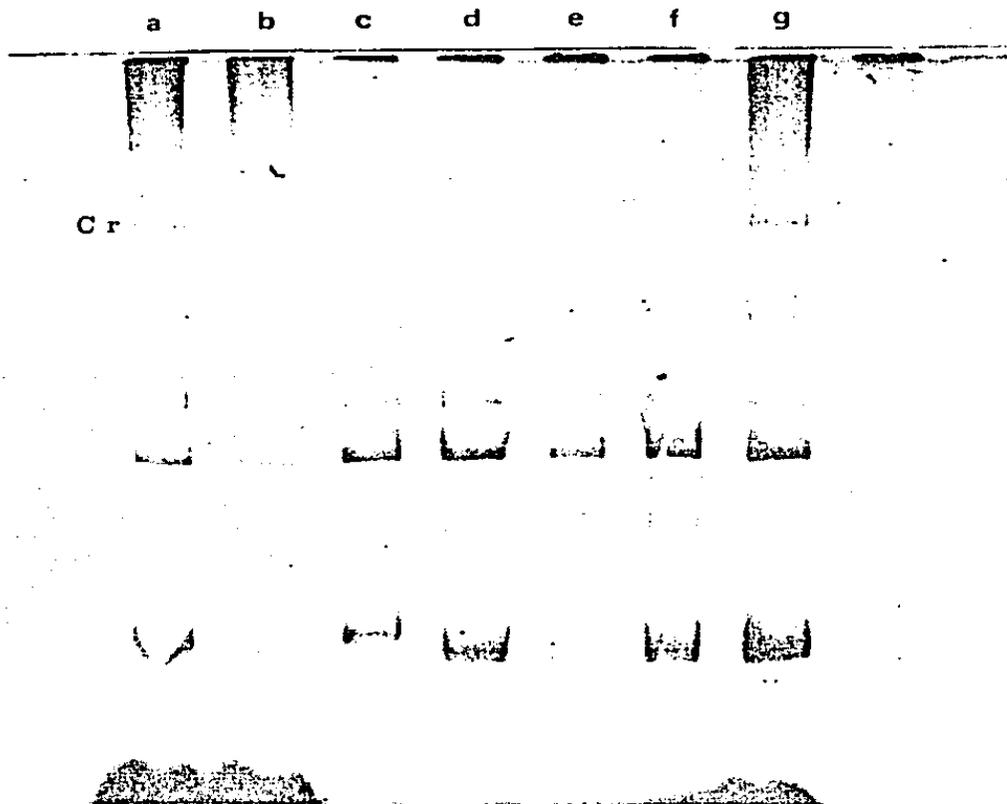


Figura 9.- Curación de la cepa MSH101. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio, con lisados claros de la cepa MSH101 tratada con diferentes sustancias: a) MSH10; b) a g) MSH101. Las cepas se trataron con: c) Rifampicina 4.5  $\mu\text{g/ml}$ ; d) Bromuro de Etidio 125  $\mu\text{g/ml}$ ; e), f) y g) Novobiocina 250  $\mu\text{g/ml}$ ; e) Cepa productora de halos grandes de colicinas; f) y g) Cepas productoras de halos pequeños de colicinas; b) Cepa sin tratar. Cr, banda de cromosoma.

grupos de incompatibilidad; producir colicinas de diferente tipo y no responder de igual forma a las sustancias utilizadas en su curación.

También los fagos T4 y P1 presentaron un comportamiento diferente en Shigella; en este género la propagación del fago T4 es menor que en E. coli, sin deberse aparentemente a procesos de modificación-restricción.

El fago P1 se obtuvo en forma lisógena, lo que habla de una posible reversión del fenotipo vir a, que lo mantiene como fago lítico.

4. Recombinación de las IS1 del plásmido R100 en enterobacterias con diferente número de copias de IS1 en el cromosoma.

Se sabe que en las cepas de S. typhimurium que no contienen IS1 en el cromosoma, las dos IS1 presentes en sentido directo en el plásmido R100 recombinan con una frecuencia alta, mientras que en cepas de E. coli con 8 copias lo hacen a una frecuencia baja (67,91). El plásmido R100 está formado por dos regiones distintas separadas por dos IS1: el RTF que contiene el origen de replicación y un Tn10 que confiere resistencia a Tc y el r-det que tiene los genes de resistencia a Cm, Su, Sm y Sp. La recombinación de las IS1 induce la disociación del R100 en dos moléculas: el RTF y el r-det. Este último no se replica, así que la disociación del R100 puede seguirse por la aparición de células que pierden la resistencia a Cm, Su, Sm y Sp, pero que retienen la de Tc.

Las diferentes frecuencias de recombinación de las IS1 del R100 en E. coli y S. typhimurium sugieren un posible efecto represor en trans de las IS1 del cromosoma. Para poder probar esta hipótesis se seleccionaron cuatro cepas con un número diferente de copias de IS1 por cromosoma: Su696 (S. typhimurium), cero; MSS21 (S. typhimurium),

ocho; W3110 (*E. coli*), siete y MSH101 (*Sh. sonnei*), 56. A estas cepas se les introdujo el plásmido R100 por conjugación y posteriormente se crecieron sin presión selectiva por 125 generaciones. La recombinación de las IS<sub>1</sub> del R100 se determinó, analizando periódicamente la resistencia a Cm, Su, Sm, Sp y Tc, de las células en el cultivo. En el caso de la cepa MSS21 fue necesario relizar algunos experimentos antes. Esta cepa originalmente contenía varios plásmidos y era resistente a Su, Sm y Tc, de manera que el único marcador del R100 que podía detectarse era la resistencia a Cm. Por curación con una mezcla de bromuro de etidio y naranja de acridina, se obtuvo una cepa sensible a Su y Sp pero resistente a Tc. En la Figura 10 carriles (a) y (b), se puede ver que la cepa perdió algunos plásmidos pequeños pero no el grande, por lo tanto el debe portar el gene de resistencia a Tc. Esto impide determinar la presencia del RTF derivado del R100 por la resistencia a Tc. En la cepa MSS21 curada (MSS211), la pérdida de los marcadores de resistencia a Cm, Su, Sm y Sp del R100 podría a la recombinación de sus IS<sub>1</sub> o a la pérdida total del plásmido. La principal causa por la que el R100 podría perderse es que fuera incompatible con el plásmido grande de la MSS211.

Para determinar si existía incompatibilidad, se introdujo el plásmido pRTF-2, que es un derivado del plásmido R1-19 y que confiere resistencia a Tc (Tn<sub>10</sub>) y Km (Tn<sub>5</sub>). Este plásmido es del mismo grupo de incompatibilidad del R100. Los dos plásmidos, el pRTF-2 y el grande de MSS211 se mantuvieron estables en esta cepa, lo que implica que son compatibles (Figs. 10 y 11). Este resultado permitió realizar el experimento de recombinación de las IS<sub>1</sub> siguiendo unicamente la resistencia a Cm, Su y Sp.

Como puede verse en la Figura 11, en *E. coli* y *Sh. sonnei*, las

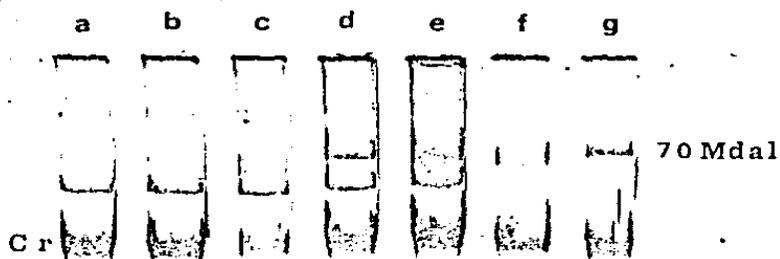


Figura 10.- Estabilidad del plásmido R100 en la cepa MSS21. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio que contiene los lisados claros de las siguientes cepas: a) MSS 21; b) MSS211; c) MSS211/pRTF-2; d) y e) MSS211/R100; f) y g) Su696/R100. Los lisados de c) y f) se obtuvieron después de crecer las cepas por 125 generaciones en fase exponencial. Los demás lisados son de cultivos de toda la noche. Cr, banda de cromosoma.

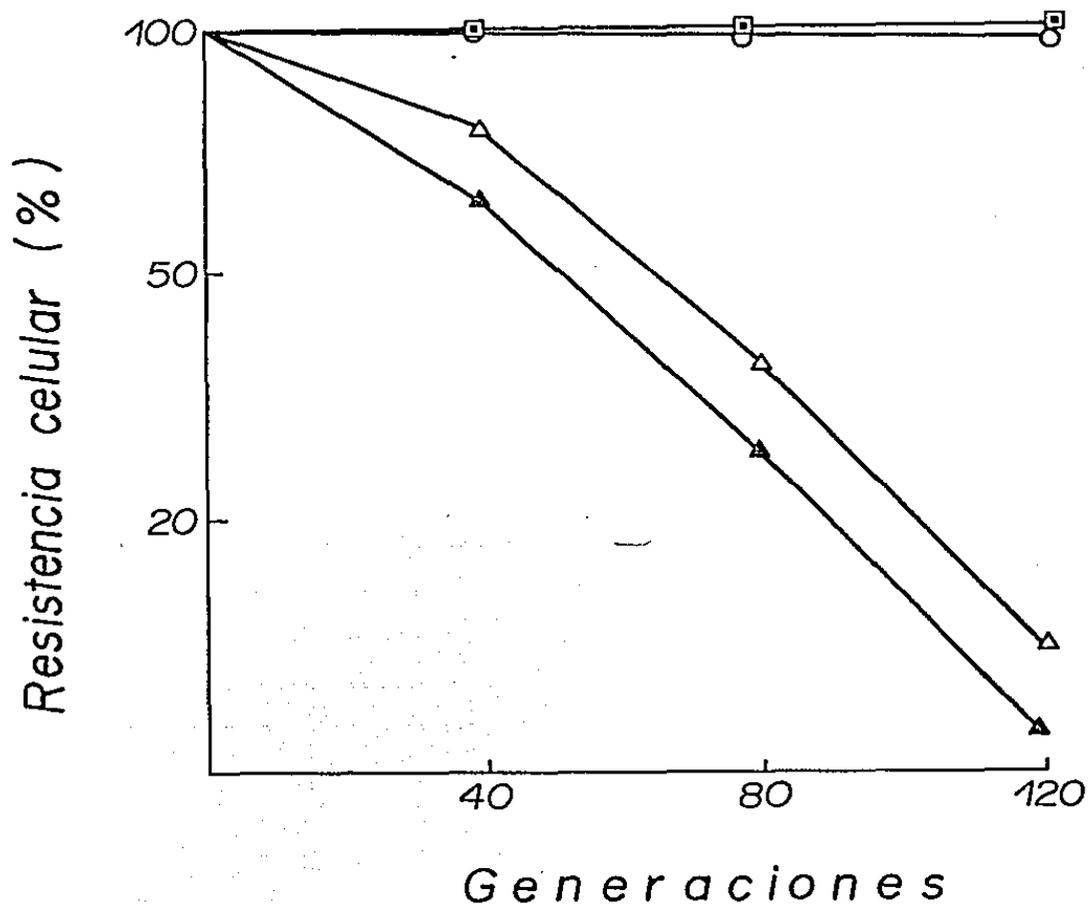


Figura 11.- Estabilidad del plásmido R100 en diferentes Enterobacterias, con distinto número de copias de la secuencia IS<sub>1</sub> en el cromosoma. (—□—) MSH101/R100; (—○—) W3110/R100; (—△—) Su696/R100; (—▲—) MSS21/R100; (—◻—) MSS21/pRTF-2. La estabilidad del plásmido R100 se estudió siguiendo la resistencia a Cm, Sp, Sm y Su. Para la estabilidad del pRTF-2 se siguió la resistencia a Km.

IS1 del R100 no recombinaron, mientras que en las dos S. typhimurium, independientemente de la presencia o ausencia de IS1 en el cromosoma, esta recombinación fue elevada. En las dos cepas de Salmonella se generaron células que perdieron el r-det, quedando únicamente el RTF (Fig. 10, carriles e y f).

Estos resultados demuestran que la presencia o ausencia de IS1 en el cromosoma no influye en la frecuencia de recombinación de otras IS1, por lo que posiblemente esta frecuencia está determinada por otros factores de la célula huésped.

5. Frecuencia de formación de cointegrados y de transposición de IS1 y de Tn9 en cepas de enterobacterias con diferente número de copias de IS1 en cromosoma.

La diferente distribución de IS1 en bacterias de géneros evolutivamente próximos, como ya se mencionó, puede obedecer a distintos factores. Uno de los factores más importantes es la frecuencia de movilización de esta secuencia en esas bacterias, que podría estar regulada por la presencia de factores difusibles producidos por las secuencias IS1 presentes en el medio. Para estudiar este factor, se cuantificó la frecuencia de formación de cointegrados inducidos por IS1, así como la frecuencia de formación de cointegrados, transposición simple y transposición inversa inducidos por Tn9, en bacterias que difieren en el número de IS1 a nivel cromosomal.

El Tn9 está formado por un gene de resistencia a Cm y dos IS1 en sentido directo. En el caso de IS1, como esta secuencia no tiene un marcador fácilmente seleccionable, es difícil cuantificar su frecuencia de transposición.

Para determinar estas frecuencias, se utilizaron los plásmidos

pBR322::IS<sub>1</sub> (Ap<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>), pBR322::Tn<sub>9</sub> (Ap<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>) y el plásmido conjugativo pOX38Km, que es un derivado del plásmido F al que se le deletaron las secuencias IS<sub>2</sub>, IS<sub>3</sub> y el Tn<sub>1000</sub> (XJ) y se le clonó el gene de Km<sup>r</sup>.

Los plásmidos pBR322 son plásmidos no conjugativos y no movilizables, de manera que los marcadores Ap<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup> y Tc<sup>r</sup> pueden pasar por conjugación únicamente a través de la formación de un cointegrado con un plásmido conjugativo o por transposición de Tn<sub>9</sub> o del pBR322 flanqueado por IS<sub>1</sub> (transposición inversa), a un plásmido conjugativo (Fig. 12). Los experimentos se hicieron con las cepas C600 (E. coli), Su694 (S. typhimurium) y MSH101 (Sh. sonnei). A estas cepas se les introdujeron los plásmidos pBR322::IS<sub>1</sub> o pBR322::Tn<sub>9</sub> por transformación y el pOX38Km por conjugación. Como células receptoras se utilizaron las mismas cepas pero resistentes a Nal y Sm: C700, Su796 y MSH103.

Para la identificación de los eventos se siguió el esquema mostrado en la Figura 12. En el caso del pBR322::IS<sub>1</sub> cuando se lleva a cabo la formación de cointegrados, la cepa receptora adquiere resistencia a Km, Ap y Tc. Con el pBR322::Tn<sub>9</sub>, se pueden identificar tres eventos: la transposición simple del Tn<sub>9</sub>, que genera una molécula que confiere resistencia a Km y Cm; la formación de cointegrados, donde se obtiene una molécula que confiere resistencia a Km, Ap, Tc y Cm; finalmente la transposición inversa que origina una molécula que confiere resistencia a Km, Ap y Tc.

En el caso de la E. coli y la Salmonella los experimentos control llevados a cabo con pBR322 no presentaron el problema de movilización del plásmido. Sin embargo, en el caso de Shigella, las cepas transconjugantes crecieron en los medios de selección con Ap y

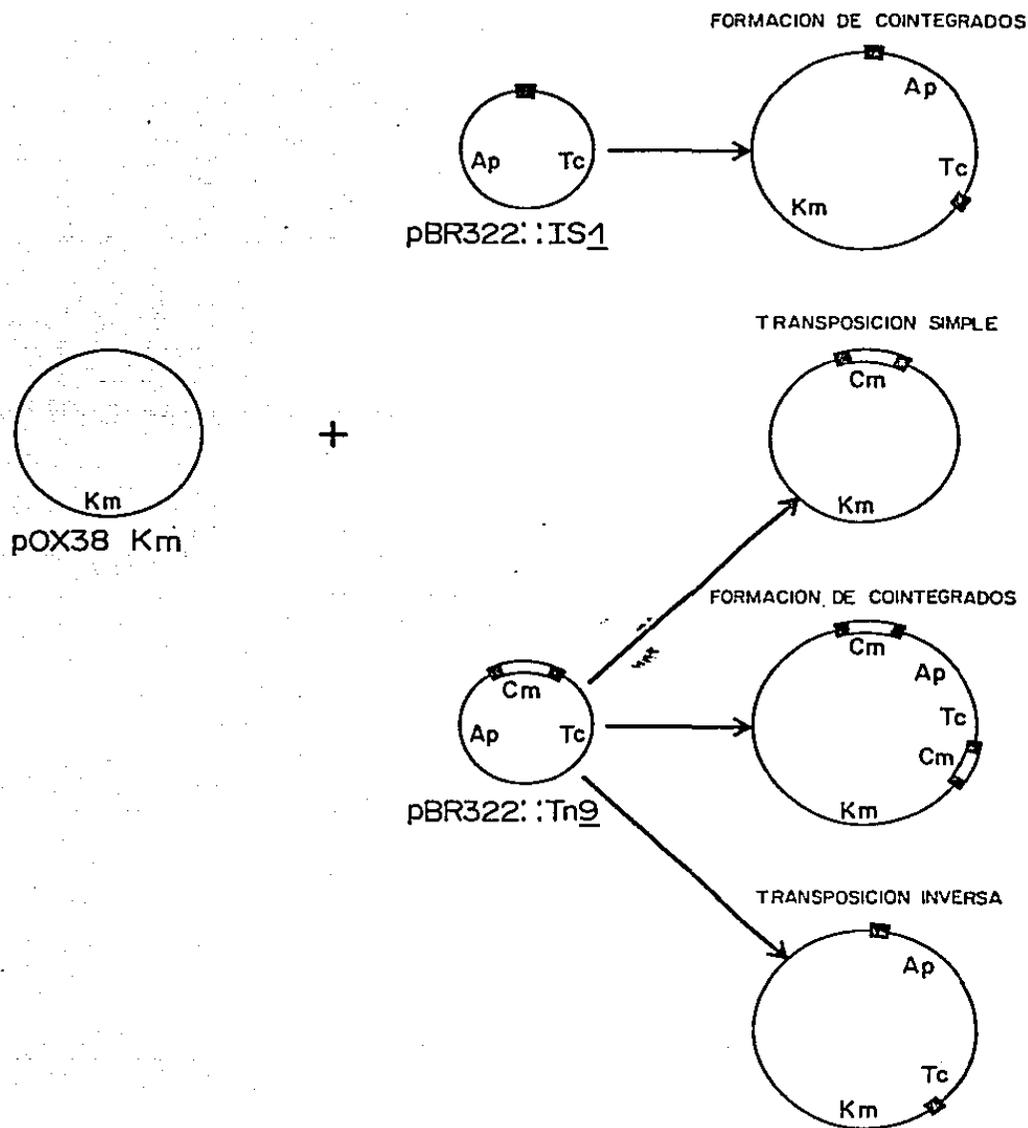


Figura 12.- Esquema para la identificación de eventos obtenidos durante la transposición de IS<sub>1</sub> ó Tn<sub>9</sub>.

Tc. Esto podría obedecer a la presencia de dos mutaciones simultáneas en la cepa receptora, lo cual es un evento de frecuencia muy baja ( $10^{-12}$  -  $10^{-16}$ ) o bien a la movilización del plásmido pBR322. Este plásmido puede ser movilizado si en la bacteria existe otro plásmido movilizable que lo complemente. Esto es posible debido a que pBR322 tiene el sitio pero no la proteína de movilización (93). Como la Shigella tiene una gran cantidad de plásmidos pequeños que pueden ser movilizables y que además hibridizan con el pBR322 en la región del sitio hom (33), lo más probable es que el pBR322 es complementado llevándose a cabo la movilización. Por lo que se decidió utilizar una bacteria receptora polA<sup>-</sup>, de manera que si el pBR322 es movilizado, no se replique.

Se utilizó como cepa receptora la MSH104 que es polA1. En este caso, el número de células que crecieron en el medio con Ap y Tc fue casi de cero; para calcular las frecuencias, el número de colonias que se obtuvieron en los experimentos control con pBR322 se restaron al de los experimentos problema.

Para calcular las diferentes frecuencias de los eventos estudiados, se hizo una división del número de células que crecieron en los medios de selección entre el total de células conjugantes. El primer valor en el caso del Tn<sub>9</sub> fue objeto de una corrección debido a que como se ve en la Figura 12, en el medio que se utilizó para seleccionar la transposición simple o inversa, pueden crecer además bacterias que contengan cointegrados. Por tal motivo el número de colonias obtenidas en el medio para seleccionar la formación de cointegrados, se restaron al obtenido en los medios de selección para transposición simple o inversa. El segundo valor se obtuvo al determinar el número de células receptoras resistentes a Km, que es la resistencia que

confiere el pOX38Km.

La frecuencia de formación de cointegrados para la IS<sub>1</sub>, se muestra en la Tabla 8. Como se puede observar, el evento es más frecuente en S. typhimurium, luego en Sh. sonnei y por último en E. coli. La diferencia entre S. typhimurium y E. coli fue de 80 veces, mientras que entre Salmonella y Shigella fue únicamente de 3 veces.

Los valores que se obtuvieron para el Tn<sub>9</sub> se muestran en la Tabla 9. Al igual que con la IS<sub>1</sub>, el total de eventos analizados fue mayor en la S. typhimurium que en las otras enterobacterias; la diferencia con Shigella fue de 256 veces, mientras que con E. coli fue de 10<sup>4</sup> veces.

Los resultados anteriores muestran que la frecuencia de eventos estudiados, mediados por IS<sub>1</sub>, es menor en los dos géneros que tienen IS<sub>1</sub> en el cromosoma (Escherichia y Shigella) que en Salmonella que carece de esta secuencia. Esto sugiere que IS<sub>1</sub>, al igual que otros EGM (Tn<sub>3</sub>, Tn<sub>5</sub> y Tn<sub>10</sub>) (7,10,29), codifica para un represor que inhibe su propia transposición.

Sin embargo, la frecuencia de eventos es menor en E. coli que en Shigella, a pesar de que la segunda tiene un número mayor de IS<sub>1</sub> en el cromosoma.

Por otro lado, si se supone que IS<sub>1</sub> o Tn<sub>9</sub> siguen un mecanismo de transposición replicativa y que esto implica la formación de una molécula intermediaria, la cual depende de las transposasas y de proteínas del huésped implicadas en replicación, a mayor replicación habrá mayor frecuencia de eventos, pero además se favorece el evento de formación de cointegrados y disminuyen los eventos de transposición. Si se observa la Figura 13 y la Tabla 9, se puede ver que tanto en E. coli como en Shigella, las frecuencias de los eventos de transposición son mayores que la formación de cointegrados, mientras que en Salmonella

Tabla 8.- Frecuencia de formación de cointegrados de la IS1 en diferentes Enterobacterias.<sup>a</sup>

Enterobacteria	Formación de cointegrados
<u>E. coli</u>	$2.15 \times 10^{-7}$
<u>Sh. sonnei</u>	$5.93 \times 10^{-6}$
<u>S. typhimurium</u>	$1.75 \times 10^{-5}$

<sup>a</sup> Los valores son un promedio de 5 a 8 experimentos.

Tabla 9.- Frecuencias de transposición simple, formación de cointegrados y transposición inversa del Tn<sub>9</sub> en diferentes Enterobacterias.<sup>a</sup>

Enterobacterias	Transposición simple	Formación de cointegrados	Transposición inversa	Total de eventos
<u>E. coli</u>	$6.56 \times 10^{-7}$	$2.01 \times 10^{-7}$	$3.72 \times 10^{-7}$	$1.27 \times 10^{-6}$
<u>Sh. sonnei</u>	$2.91 \times 10^{-5}$	$9.65 \times 10^{-6}$	$1.05 \times 10^{-5}$	$4.92 \times 10^{-5}$
<u>S. typhimurium</u>	$3.23 \times 10^{-3}$	$6.22 \times 10^{-3}$	$3.15 \times 10^{-3}$	$1.26 \times 10^{-2}$

<sup>a</sup> Los valores son un promedio de 5 a 8 experimentos.

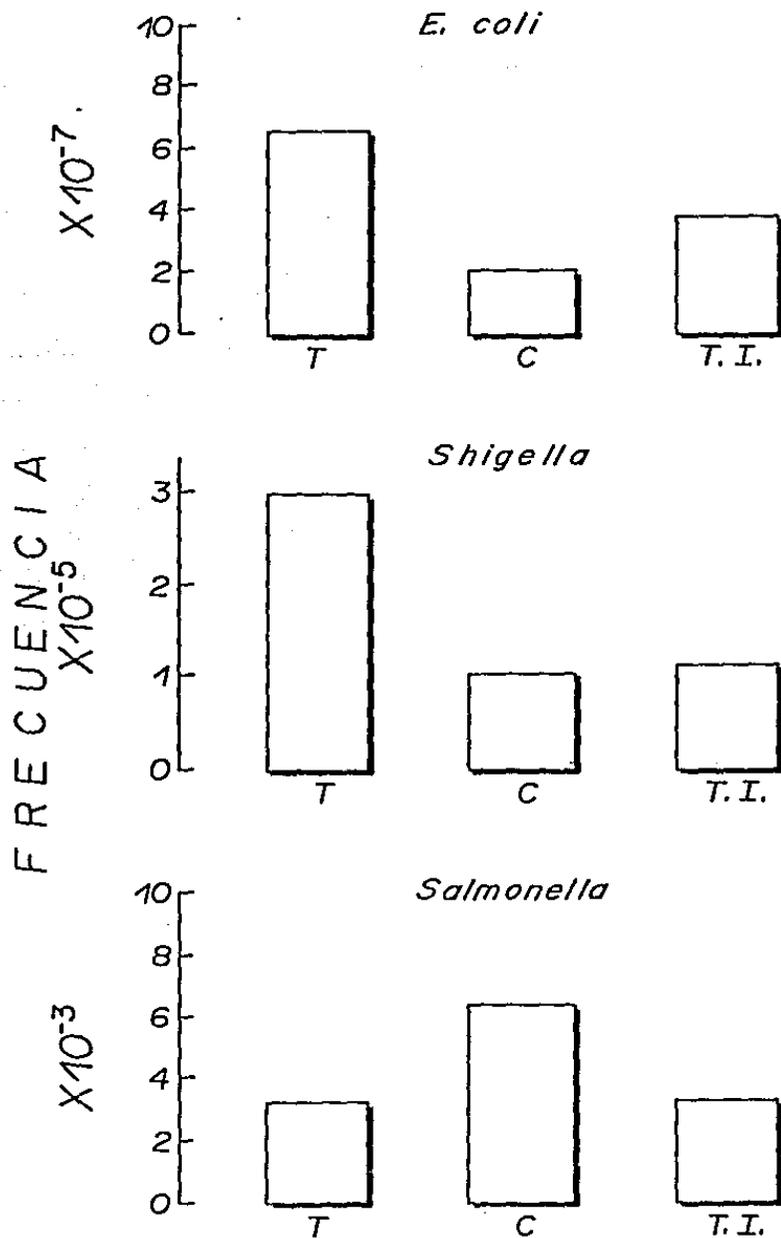


Figura 13.- Frecuencia de transposición simple (T), formación de cointegrados (C) y transposición inversa (T.I.) del Tn<sub>9</sub> en diferentes Enterobacterias. Valores tomados de la Tabla 9.

lla se tiene lo contrario, la formación de cointegrados es mayor que los eventos de transposición. Por lo que también es factible que la regulación de los eventos mediados por IS1, se deba a factores del huésped aunados a productos difusibles codificados por la propia se cuencia.

También se obtuvo una cepa de Salmonella recA<sup>-</sup> (Su896), utilizando a la cepa Su696 como receptora y a la cepa MA766 Hfr recA<sup>-</sup> Tn10, como cepa donadora, en esta cepa el Tn10 se localiza muy cerca de recA<sup>-</sup>, de manera que seleccionando para Tc<sup>r</sup> y posteriormente con la prueba de Nitrofurantoina se obtuvo la cepa recA<sup>-</sup>.

En esta cepa se estudiaron los eventos de transposición simple y formación de cointegrados del Tn9. Para el primero se encontró una frecuencia de  $7 \times 10^{-5}$  y para el segundo de  $1.39 \times 10^{-4}$ . Se obtuvo una disminución en la frecuencia de aproximadamente 45 veces en relación a la recA<sup>+</sup>, esta disminución es similar a la encontrada en cepas recA<sup>-</sup> de E. coli en relación a las cepas recA<sup>+</sup> (73,74). Sin embargo, la relación de los eventos fue la misma que en la Su696; esto es, la formación de cointegrados es el doble de la transposición.

Esto indica que los sistemas de recombinación homóloga en Salmonella al igual que en E. coli, no influyen de manera significativa en los eventos mediados por IS1.

## D I S C U S I O N

La presencia de más de una IS1 en el cromosoma y/o en los plásmidos, puede generar diversos rearrreglos moleculares, ya sea por recombinación homóloga o por transposición. La dinámica de intercambio de IS1 entre el cromosoma bacteriano, fagos y plásmidos, así como el intercambio de estos últimos entre diferentes especies e incluso géneros de bacterias tendería a generar un incremento en el número de EGM así como su diseminación entre las bacterias.

Para profundizar en el conocimiento de la dinámica molecular de la IS1, se estudió esta secuencia en enterobacterias con un número diferente de copias de esta secuencia en el cromosoma: Escherichia, Salmonella y Shigella.

La cuantificación del número de copias de IS1, presentes en dos cepas de Shigella y dos cepas de Salmonella aisladas en México mostró que el número es similar (cero copias para S. typhimurium y más de 40 para Shigella) al reportado para cepas de estos géneros aisladas en otros países. Sin embargo, en este estudio se encontró una S. typhimurium con aproximadamente 8 copias.

Estos datos sugieren que el número de copias de esta secuencia está bajo algún tipo de regulación, la cual es diferente en cada género. La ausencia de IS1 en la mayoría de las Salmonellas analizadas por otros grupos y en este trabajo, no se debe a una baja frecuencia de transposición de IS1 en este género, ya que como se muestra en las Tablas 8 y 9, incluso esta frecuencia es más elevada en este género que en Escherichia o Shigella. En Salmonella también la frecuencia de recombinación de dos IS1 en sentido directo localizadas en la misma molécula es más elevada (Fig. 11). Estos datos, más el hecho de que

una cepa de S. typhimurium presentó 8 copias de IS1 sugieren que posiblemente el género Salmonella surgió evolutivamente después de Escherichia y Shigella, por lo que aún no ha llegado al punto de equilibrio que define el número de copias de IS1, que será característico de este género.

Otro factor que puede influir en la cinética de diseminación de IS1 entre diferentes enterobacterias, es su grado de homología genética ya que ésta contribuye a determinar la eficiencia de intercambio genético entre las bacterias. Esta homología es mayor entre Escherichia y Shigella que entre estos dos géneros y Salmonella.

El análisis de la distribución de las copias de IS1 en Shigella mostró que en la mayoría de las cepas, las IS1 se localizan principalmente en el cromosoma. En tres cepas de once analizadas, se encontró IS1 en un plásmido grande y únicamente en una cepa, plásmidos pequeños tenían IS1. Estos datos reflejan indirectamente la cinética de movilización de IS1 entre el cromosoma y los plásmidos en Shigella. Una cinética rápida de intercambio principalmente entre el cromosoma, que contiene un alto número de copias de IS1 y los plásmidos pequeños que a su vez también se encuentran en un número alto de copias, generaría el que estos adquirieran IS1, ya sea por transposición simple o por medio de transposones compuestos. Estos transposones compuestos podrían estar formados por dos IS1 que flanquearan a la distancia adecuada a genes cromosomales.

La ausencia de IS1 en la mayoría de los plásmidos pequeños, puede deberse a que estos son de aparición reciente; que la frecuencia de transposición cromosoma-plásmido, es menor a la encontrada en este trabajo, para la transposición plásmido-plásmido de una IS1 activa en transposición o bien, a que la mayoría de las IS1 presentes en

el cromosoma son inactivas.

En apoyo de la última propuesta está el reporte de que en Shigella las IS1 constituyen una familia de secuencias similares, pero no idénticas (60,75), por lo que es posible que muchas de ellas sean mutantes en transposición. Por otra parte, la expresión de algunas IS1 puede estar inhibida por la transcripción de genes vecinos (12,59).

La distribución de las IS1 en las enterobacterias puede deberse, entre otros factores, a las características genéticas particulares de cada género. Aunque el grado de homología DNA-DNA entre Escherichia y Shigella es alto (80-90%), el número de IS1 y la frecuencia de su movilización es diferente (Tablas 3, 8 y 9).

En este trabajo se encontraron además otras diferencias entre estos dos géneros, principalmente en las propiedades de los plásmidos pequeños y en el comportamiento de los fagos T4 y P1.

Los plásmidos pequeños de Shigella tienen el origen de replicación y el sistema de movilización similares a los del plásmido ColE1; sin embargo, son compatibles con este plásmido y no requieren de la DNA polimerasa I para replicarse. Esto implica que en Shigella los plásmidos pequeños, se replican por un sistema enzimático diferente, al que utilizan en E. coli para su replicación los plásmidos tipo ColE1. Además, los plásmidos pequeños de Shigella, codifican para colicinas diferentes a la colicina E1 y no se curan con los métodos que son efectivos para eliminar plásmidos pequeños en E. coli.

La diferencia entre Shigella y Escherichia, también se manifestó en el comportamiento hacia los fagos utilizados, como en el caso del T4; su propagación fue menos eficiente en Shigella que en E. coli. Esto podría deberse a los sistemas de modificación-restricción, si se tratara de este proceso, al propagar T4 en Shigella y titular en E.

coli, el título debería ser menor en E. coli que en Shigella, lo cual no ocurrió, siempre se obtuvo un título de 2 a 3 veces menor en Shigella que en E. coli, por lo que esto podría deberse a otros factores.

Otro fago que presentó un comportamiento diferente fue P1, que a pesar de tratarse de una cepa lítica, en algunas ocasiones revirtió a su forma lisógena en Shigella. Esto podría deberse al gran número de copias de IS1 en este género, ya que se ha reportado que dos terceras partes de las mutaciones de P1 se deben a inserciones de esta secuencia (3).

Para estudiar los factores que influyen en la dinámica molecular de la IS1 en diferentes enterobacterias, después de determinar su número y distribución en Escherichia, Salmonella y Shigella, se cuantificaron algunos de los eventos inducidos por IS1 (transposición, formación de cointegrados y recombinación), en estas bacterias.

La hipótesis de que las IS1 del cromosoma inhiban en trans la recombinación de las IS1 del plásmido R100, puede descartarse, ya que esta recombinación fue similar en cepas de Salmonella con o sin IS1 en el cromosoma (Fig. 11). Las diferencias en la frecuencia de recombinación de IS1 en Escherichia, Salmonella y Shigella, probablemente se deben a diferencias en la información genética de estas bacterias, relacionada con la capacidad de recombinar secuencias homólogas.

Los eventos de transposición y de formación de cointegrados fueron, al igual que el de recombinación de IS1, más frecuentes en Salmonella que en Escherichia y Shigella, lo que hablaría de que en bacterias con IS1 en cromosoma, se presenta un efecto inhibitorio en trans de la actividad de esta secuencia. Sin embargo, en el caso de transposición y formación de cointegrados, no se estudió de una manera más directa el efecto de las IS1 del cromosoma. La única cepa de Salmone-

lla (MSS21) con IS1 presentó un plásmido grande, posiblemente conjugativo, no curable y que confiere resistencia a Tc. La presencia de este plásmido, impidió tener el sistema de selección adecuado para la cuantificación de estos eventos. Las diferencias encontradas, podrían explicarse por las características genéticas propias de cada género, aunque es posible que también influya el número de copias de IS1 en el cromosoma. En este caso, como se ha descrito para otros EGM (7, 10, 29), las IS1 codificarían para moléculas represoras de la transposición de la propia IS1 y de otras IS1, lo que causaría que las cepas con un alto número de IS1 presentaran frecuencias bajas de transposición.

Por otra parte, el que se tenga una mayor represión en E. coli que en Shigella, no obstante que ésta última tiene 7 veces más IS1 en el cromosoma, puede deberse a la presencia de iso-secuencias de inserción, que presenten diferencias en cuanto a su actividad. Como ya se mencionó antes en esta discusión, las cepas de Shigella portan una serie de IS1 que difieren en la secuencia de nucleótidos en unas pocas pb, con respecto a la IS1-K de E. coli K12.

La IS1 presente en el pBR322 utilizado en los experimentos, fue obtenida de E. coli, por lo que al ser introducida en Shigella, los represores ahí presentes tal vez la inhibieron de una manera menos efectiva, por presentar una secuencia diferente a las IS1 que producen el represor.

El evento que con mayor frecuencia se presentó en Salmonella fue la formación de cointegrados, mientras que en E. coli y Shigella fue la transposición tanto simple como inversa.

De acuerdo con el último modelo propuesto para la transposición de IS1 y  $\mu$ , se propone que a mayor replicación, mayor frecuencia de eventos, principalmente formación de cointegrados.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Una posibilidad es que la eficiencia de replicación sea mayor en Salmonella, que en las otras enterobacterias estudiadas, con lo que se tendría que el evento más favorecido es la formación de cointegrados, mientras que si en E. coli y Shigella la replicación es menor, la transposición sería el evento más favorecido.

Así tenemos que la cuantificación de algunos de los eventos inducidos por IS<sub>1</sub>, como son la formación de cointegrados y la transposición simple o inversa de Tn<sub>9</sub>, junto con la disociación del plásmido R100, permitieron profundizar en el conocimiento de la dinámica molecular de esta secuencia en varias enterobacterias, así como en los factores que influyen en ella.

## C O N C L U S I O N E S

1. El número de copias de IS<sub>1</sub> en el cromosoma de las cepas estudiadas es de 6-7 en E. coli, de 40-60 en Shigella y cero u 8 en Salmonella. El número promedio de IS<sub>1</sub> en cada género es similar al de cepas aisladas en diferentes países.

2. Una cepa de Salmonella presentó 8 copias de IS<sub>1</sub> en el cromosoma, lo cual podría indicar que su aparición es reciente en este género bacteriano.

3. La secuencia IS<sub>1</sub> se localizó principalmente en el cromosoma de las cepas de Shigella estudiadas. Sólo en tres cepas se localizó también en plásmidos. Esto sugiere una baja movilización de la IS<sub>1</sub> del cromosoma a los plásmidos.

4. Los plásmidos pequeños de Shigella tienen propiedades diferentes a los estudiados en E. coli, en especial por no requerir de la DNA polimerasa I para su replicación.

5. La frecuencia de recombinación de las IS<sub>1</sub> del plásmido R100 resultó ser independiente de la presencia de IS<sub>1</sub> en el cromosoma.

6. Los eventos de transposición simple, transposición inversa y formación de cointegrados tienen una frecuencia más elevada en Salmonella, le siguen en Shigella y por último en E. coli. Lo cual podría sugerir que las IS<sub>1</sub> del cromosoma reprimen la frecuencia de transposición de otras IS<sub>1</sub>. La diferencia entre E. coli y Shigella puede deberse a que tienen iso-secuencias de inserción con facilidad de represión diferente.

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

1. Alton, N. and D. Vapnek. 1979. Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn<sub>9</sub>. *Nature* 282: 864-869.
2. Arber, W. 1974. DNA modification and restriction. *Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 14: 1 - 37.
3. Arber, W., A. Iida, H. Jütte, P. Caspers, J. Meyer and C. Hänni. 1978. Rearrangements of genetic material in Escherichia coli as observed on the bacteriophage P1 plasmid. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 1197 - 1208.
4. Backman, K. and M. Ptashne. 1978. Maximizing gene expression on a plasmid using recombination in vitro. *Cell* 13: 65 - 71.
5. Bastarrachea, F. and N. Willets. 1969. The elimination by Acridine Orange of F30 from recombination-deficient strains of E. coli K12. *Genetics* 59: 153 - 166.
6. Bazzicalupo, P. and G. Tocchini-Valentini. 1972. Curing of an Escherichia coli episome by Rifampin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 298 - 300.
7. Beck, C., H. Moyed and J. Ingraham. 1980. The tetracycline resistance transposon Tn<sub>10</sub> inhibits translocation of Tn<sub>10</sub>. *Mol. Gen. Genet.* 179: 453 - 455.
8. Berg, D. 1985. Mechanisms of transposition in bacteria. p. 33 - 44 In D. R. Helinski, S. N. Cohen, D. B. Clewell, D. A. Jackson and A. Hollaender . (ed.). *Plasmids in Bacteria*. Plenum Press. New York.
9. Betlach, M., V. Hershfield, L. Chow, W. Brown, H. Goodman and H. W. Boyer. 1976. A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoR1 restriction and modification

- of DNA. Federation Proc. 35: 2037 - 2043.
10. Biek, D. and J. Roth. 1981. Regulation of Tn<sub>5</sub> transposition. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45: 189 - 191.
  11. Biel, S. and D. Berg. 1984. Mechanism of IS<sub>1</sub> transposition in E. coli: choice between simple insertion and cointegration. Genetics 108: 319 - 330.
  12. Biel, S., G. Adelt, and D. Berg. 1984. Transcriptional control of IS<sub>1</sub> transposition in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 174: 251-264.
  13. Bolivar, F., L. R. Rodríguez, C. Betlach, and H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistance derivatives of the plasmid pMB9. Gene 2: 75 - 93.
  14. Bovanchaud, D., M. Scavizzi, and Y. Chabbert. 1969. Elimination by Ethidium Bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci. J. Gen. Microbiol. 54: 417 - 425.
  15. Boyer, H.W. 1971. DNA restriction and modification mechanism in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 25: 153- 176.
  16. Brahma, N., A. Schumacher, J. Cullum, and H. Saedler. 1982. Distribution of the Escherichia coli K12 Insertion Sequences IS<sub>1</sub>, IS<sub>2</sub> and IS<sub>3</sub> among other bacterial species. J. Gen. Microbiol. 128: 2229 - 2234.
  17. Brenner, D. J. and S. Falkow. 1971. Molecular relationships among members of the Enterobacteriaceae. Adv. Genet. 16: 81 - 118.
  18. Buchanan, R. E. and N. Gibbons. (ed.). 1979. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn. Williams & Wilkins. Baltimore.
  19. Calos, M., L. Johnsrud, and J. Miller. 1978. DNA sequence at the integration site of the insertion element IS<sub>1</sub>. Cell 13: 411- 418.

20. Calos, M. and J. Miller. 1980. Transposable elements. *Cell* 20: 579 - 596.
21. Campbell, A. 1981. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 55 - 83.
22. Chandler, M., B. Allet, E. Gallay, E. Boy de la Tour, and L. Caro. 1977. Involvement of IS<sub>1</sub> in the dissociation of the r-determinant and RTF components of the plasmid R100.1. *Molec. Gen. Genet.* 183: 289 - 295.
23. Chandler, M., M. Clerget, and L. Caro. 1981. IS<sub>1</sub> promoted events associated with drug resistance plasmid. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45: 157 - 165.
24. Chandler, M., J. Séchaud, and L. Caro. 1982. A mutant of the plasmid R100.1 capable of producing autonomous circular forms of its resistance determinant. *Plasmid* 7: 251 - 262.
25. Chandler, M., M. Clerget, and D.J. Galas. 1982. The transposition frequency of IS<sub>1</sub>-flanked transposons is a function of their size. *J. Mol. Biol.* 154: 229 - 243.
26. Chandler, M. and D. J. Galas. 1983. Cointegrate formation mediated by Tn<sub>9</sub>. II. Activity of IS<sub>1</sub> is modulated by external DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 170: 61 - 91.
27. Chandler, M., and D. J. Galas. 1985. Studies on the transposition of IS<sub>1</sub>. p. 53 - 77. In D. R. Helinski, S. N. Cohen, D. B. Clewell, D. A. Jackson, and A. Hollander. (ed.). *Plasmids in Bacteria*. Plenum Press. New York.
28. Chernin, L. and V. Mikoyan. 1981. Effects of plasmids on chromosome metabolism in bacteria. *Plasmid* 6: 119 - 140.
29. Chou, J., P. Lemaux, M. Casadaban, and S. N. Cohen. 1979. Trans-

- position protein of Tn<sub>3</sub> identification and characterization of an essential repressor controlled gene product. *Nature* 282: 801-806.
30. Clewell, D. 1972. Nature of ColE1 plasmid replication in Escherichia coli in the presence of Chloramphenicol. *J. Bacteriol.* 110: 667 - 676.
  31. Cohen, S. N., and J.A. Shapiro. 1980. Transposable genetic elements. *Sci. Am.* 242: 40 - 49.
  32. Craigie, R. and K. Mizuuchi. 1985. Mechanism of transposition of bacteriophage Mu: structure of a transposition intermediate. *Cell* 41: 867 - 876.
  33. Croft, J., P. Bergquist, and D. Lane. 1983. A cryptic plasmid from Shigella sonnei. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1513 - 1525.
  34. Davison, J. 1984. Mechanism of control of DNA replication and incompatibility in ColE1-type plasmids. *Gene* 28: 1 - 15.
  35. Galas, D. J., and M. Chandler. 1981. On the molecular mechanism of transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 4858 - 4862.
  36. Galas, D. J., and M. Chandler. 1982. Structure and stability of Tn<sub>9</sub> mediated cointegrates: evidence for two pathways of transposition. *J. Mol. Biol.* 154: 245 - 272.
  37. Galas, D. J., and T. Smith. 1984. The relationship between codon boundaries and multiple readingframe preferences: coding organization of bacterial insertion sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1: 260-268.
  38. Gómez-Eichelmann, M. C., and H. Torres. 1983. Stability of plasmids R1-19 and R100 in Hyper-recombinant Escherichia coli strains and in Salmonella typhimurium strains. *J. Bacteriol.* 154: 1493 - 1497.

39. Grindley, N. D.F. 1978. IS<sub>1</sub> insertion generates a duplication of a nine base pair sequences at its target site. *Cell* 13: 419- 426.
40. Grunstein, M., and D. Hogness. 1975. Colony hibridization: a method for isolated a cloned DNA that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 158 - 164.
41. Harshey, R., and A. Bukhari. 1981. A mechanism of DNA transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1090 - 1094.
42. Hashimoto, H. and R. Rownd. 1975. Transition of the R factor NR1 in Proteus mirabilis: level of drug resistance of non-transitio-  
ned and transitioned cells. *J. Bacteriol.* 123: 56 - 68.
43. Hu, M., and R. Deonier. 1981. Comparison of IS<sub>1</sub>, IS<sub>2</sub> and IS<sub>3</sub> copy number in Escherichia coli strains K12, B and C. *Gene* 16: 161-170.
44. Hu, S., E. Ohtsubo, N. Davidson, and H. Saedler. 1975. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relationship among bacterial plasmids: identification and mapping of the insertion sequences IS<sub>1</sub> and IS<sub>2</sub> in F and R plasmids. *J. Bacteriol.* 122: 764 - 775.
45. Iida, S., J. Meyer, and W. Arber. 1978. The insertion element IS<sub>1</sub> is a natural constituent of coliphage P1 DNA. *Plasmid* 1: 357-365.
46. Iida, S., J. Meyer, and W. Arber. 1981. Genesis and natural history of IS-mediated transposons. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 45: 27 - 43.
47. Iida, S. 1983. On the origen of the Chloramphenicol resistance transposon Tn<sub>9</sub>. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1217 - 1225.
48. Iida, S., J. Meyer, and W. Arber. 1983. Procariotic IS elements. p. 159- 221. In J. A. Shapiro (ed.). *Mobile Genetic Elements*. Academic Press. New York.

49. Jenkins, S., and M. Bennett. 1976. Effect of mutations in desoxyribonucleic acid repair pathway on the sensitivity of Escherichia coli K12 strains to nitrofurantoin. J. Bacteriol. 125: 1214 - 1216.
50. Johnsrud, L., M. Calos, and J. Miller. 1978. The transposon Tn<sub>9</sub> generates a 9 pb repeated sequence during integration. Cell 15: 1209 - 1219.
51. Johnsrud, L. 1979. DNA sequence of the transposable element IS<sub>1</sub>. Mol. Gen. Genet. 169: 213 - 218.
52. Kafatos, F., W. Jones, and A. Estratiadis. 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. Nucleic Acids Res. 7: 1541 - 1552.
53. Kingsbury, D., and D. Helinski. 1970. DNA polymerase as a requirement for the maintenance of the bacterial plasmid colicinogenic factor E1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 1538 - 1544.
54. Kleckner, N. 1981. Transposable elements in procaryotes. Ann. Rev. Genet. 15: 341 - 404.
55. Kuperztock-Portnoy, Y. 1981. Antibiotic resistance of Gram negative bacteria in México: relationship to drug consumption. p. 529 - 537. In S. B. Levy, R. C. Clowes, and E. L. Koenig. (ed.). Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids. Plenum Press. New York.
56. Lennox, E. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology 1: 190 - 206.
57. Luria, S. E., and J. W. Burrous. 1957. Hybridization between Escherichia coli and Shigella. J. Bacteriol. 74: 461.

58. Machida, Y., C. Machida, H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo. 1982. Factors determining frequency of plasmid cointegration mediated by insertion sequence IS1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 277 - 281.
59. Machida, C., Y. Machida, H. Wang, K. Ishizaki, and E. Ohtsubo. 1983. Repression of cointegration ability of insertion element IS1 by transcriptional readthrough from flanking regions. Cell 34: 135 - 142.
60. Malamy, M. H., P. T. Rahaim, C. S. Hoffman, D. Baghdoyan, M. B. O'Connor, and J. F. Miller. 1985. A frameshift mutation at the junction of an IS1 insertion within lacZ restores  $\beta$ -Galactosidase activity via formation of an active lacZ-IS1 fusion protein. J. Mol. Biol. 181: 551 - 555.
61. Maniatis, T., E. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
62. Mendez, B. 1984. Elementos genéticos móviles en procariotes. Adel. Microbiol. Enf. Infecc. 3: 137 - 158.
63. Miller, J. 1972. Experiments in molecular genetics. 2da.Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
64. Mitsuhashi, S., K. Harada, and H. Hashimoto. 1960. Multiple resistance of bacteria and transmission of drug-resistance to other strains by mixed cultivation. Jap. J. Exp. Med. 30: 179 - 184.
65. Mukhopadhyay, P., V. Syrowik, and S. Palchaudhuri. 1983. Trimethoprim-induced DNA polymerase I deficiency in Escherichia coli K12. J. Bacteriol. 154: 1098 - 1103.
66. Nisen, P., M. Purucker, and L. Shapiro. 1979. Deoxyribonucleic

- acid sequence homologies among bacterial insertion sequence elements and genomes of various organisms. *J. Bacteriol.* 140: 588-596.
67. Nisioka, T., M. Mitani, and R. Clowes. 1970. Molecular recombination between R factor deoxyribonucleic acid molecules in Escherichia coli host cells. *J. Bacteriol.* 130: 166 - 177.
68. Nordström, K., S. Molin, and H. Aagaard-Hansen. 1980. Partitioning of plasmid R1 in E. coli. II Incompatibility properties of the partitioning system. *Plasmid* 4: 332 - 349.
69. Novick, R. P. 1974. Bacterial plasmids. p. 537 - 586. In A. I. Laskin, and M. A. Lechevalier. (ed.). *Handbook of Microbiology* Vol. 4. CRS Press. Cleveland, Ohio.
70. Novick, R. P., P. C. Clowes, S. Cohen, R. Curtiss, N. Data, and S. Falkow. 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* 40: 168 - 189.
71. Novick, R. P. 1980. Plasmids. *Sci. Am.* 243: 102 - 127.
72. Nyman, K., K. Nakamura, H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo. 1981. Distribution of the insertion sequence IS1 in Gram-negative bacteria. *Nature* 289: 609 - 612.
73. Ohtsubo, E., M. Zenilman, and H. Ohtsubo. 1980. Plasmids containing insertion sequence are potential transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 750 - 754.
74. Ohtsubo, E., M. Zenilman, H. Ohtsubo, M. Mc Cormick, C. Machida, and Y. Machida. 1981. Mechanism of insertion and cointegration mediated by IS1 and Tn3. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 45: 283 - 295.
75. Ohtsubo, H., K. Nyman, W. Doroszkiewicz, and E. Ohtsubo. 1981. Multiple copies of iso-insertion sequence of IS1 in Shigella

- dysenteriae chromosome. *Nature* 292: 640 - 643.
76. Ohtsubo, E., and H. Ohtsubo. 1978. Nucleotide sequence of an insertion sequence, IS<sub>1</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 615 - 619.
  77. Olarte, J. 1981. R factors present in epidemic strains of Shigella and Salmonella species found in Mexico. p. 11 - 19. In S. B. Levy, R. C. Clowes and E. L. Koenig. (ed.). *Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids*. Plenum Press. New York.
  78. Ptashne, K., and S. Cohen. 1975. Occurrence of insertion sequence (IS) regions on plasmid deoxyribonucleic acid as direct and inverted duplications. *J. Bacteriol.* 122: 776 - 781.
  79. Reif, H. J., and H. Saedler. 1975. IS<sub>1</sub> is involved in deletion formation in the gal region of E. coli K12. *Mol. Gen. Genet.* 137: 17 - 28.
  80. Reif, H. J. 1980. Genetic evidence for absence of transposition functions from the internal part of Tn981 a relative of Tn9. *Mol. Gen. Genet.* 177: 667 - 674.
  81. Reynolds, A., J. Felton, and A. Wright. 1981. Insertion of DNA activates the cryptic bgl operon in E. coli K12. *Nature* 293: 625 - 629.
  82. Rosner, J. L., and M. M. Gottesman. 1977. Transposition and deletion of Tn9: a transposable element carrying the gene for Chloramphenicol resistance. p. 213 - 218. In A. I. Bukhari, J. A. Shapiro, and S. L. Adhya. (ed.). *DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
  83. Rosner, J., and M. Guyer. 1980. Transposition of IS<sub>1</sub>- $\lambda$ BIO-IS<sub>1</sub>

- from a bacteriophage  $\lambda$  derivated carrying the IS1-cat-IS1 transposon (Tn9). Molec. Gen. Genet. 178: 111 - 120.
84. Saedler, H., and B. Heiss. 1973. Multiple copies of the insertion DNA sequence IS1 and IS2 in the chromosome of E. coli K12. Mol. Gen. Genet. 122: 267 - 277.
85. Saedler, H., G. Cornelis, J. Cullum, B. Schumacher, and H. Sommer. 1980. IS1-mediated DNA rearrangements. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45: 93 - 98.
86. Sanderson, K. E. 1971. Genetic homology in the Enterobacteriaceae. Adv. Genet. 16: 35 - 51.
87. Schmitt, R. 1985. Structure and Function. p. 17 - 19. In D.R. Helinski, S. N. Cohen, D. B. Clewell, D. A. Jackson, and A. Hollander. (ed.). Plasmids in Bacteria. Plenum Press. New York.
88. Shedlovsky, A. and S. Brenner. 1963. A chemical basis for the host-induced modification of T-even bacteriophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 50: 300 - 304.
89. Starlinger, P., and H. Saedler. 1976. IS elements in microorganisms. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 75: 111 - 153.
90. Starlinger, P. 1977. Mutations caused by the integration of IS1 and IS2 into the gal operon. p. 25 - 36. In A. J. Bukhari, J. A. Shapiro, and S. L. Adhya. (ed.). DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
91. Stougaard, P., S. Molin, and K. Nordström. 1979. Plasmid R1 in Salmonella typhimurium: molecular instability and gene dosage effects. Plasmid 2: 589 - 597.
92. Syvanen, M. 1984. The evolutionary implications of mobile genetic elements. Ann. Rev. Genet. 18: 271 - 293.

93. Warren, G., M. Saul, and D. Sherratt. 1979. ColE1 plasmid mobility: essential and conditional functions. *Molec. Gen. Genet.* 170: 103 - 107.
94. Watanabe, T. 1963. Infectious drug resistance in enteric bacteria. *New. Engl. J. Med.* 275: 888 - 895.
95. Watanabe, H., H. Hashimoto, and S. Mitsuhashi. 1980. Salmonella typhimurium LT2 mutation affecting the deletion of resistance determinants on R plasmids. *J. Bacteriol.* 142: 145 - 152.
96. Wienert, T. A., N. A. Schaus, N. D. F. Grindley. 1983. Insertion sequence duplication in transpositional recombination. *Science* 222: 755 - 765.
97. Willets, N. S., A. J. Clarck, and B. Lois. 1969. Genetic localization of certain mutations conferring recombination deficiency in E. coli. *J. Bacteriol.* 97: 244 - 249.
98. Wolfson, J., D. Hooper, M. Swartz, and G. McHugh. 1982. Antagonism of the B subunit of DNA Gyrase eliminates plasmids pBR322 and pMG110 from Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 152: 338 - 344.
99. Zinder, N. D. 1960. Hybrids of Escherichia and Salmonella. *Science.* 131: 813 - 815.