

03062  
lej. 7  
BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y POSGRADO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

RECOMBINACION DE PLASMIDOS TIPO R EN ESCHERICHIA COLI K-12

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

JAI ME MARIANO MARTINEZ SALAZAR

MEXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1986



## **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.

## INDICE

	pág.
INTRODUCCION	1
1.- Generalidades	1
2.- Recombinación homóloga en <u>Escherichia coli</u>	3
3.- Mecanismos moleculares de recombinación homóloga	6
4.- Recombinación sitio-específica y transposición	9
5.- Recombinación homóloga de plásmidos	10
6.- Rearreglos moleculares en plásmidos R del grupo de Incompatibilidad FII	13
A)Rearreglos intramoleculares	14
B)Rearreglos intramoleculares	16
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y METODOS	19
RESULTADOS	25
1.- Obtención y caracterinación de los plásmidos pRTF-2 y PR100-T	25
A)Plásmido pRTF-2	25
B)Plásmido pR100-T	29
2.- Incompatibilidad y frecuencia de rearreglos <u>gené</u> ticos entre los plásmidos pRTF-2 y pR100-T	35
A)Selección e identificación de células con plásmidos con rearreglos genéticos. Cinética de pérdida de los marcadores genéticos	35
B)Cuantificación del fenómeno de incompatibilidad y de los rearreglos genéticos en diferentes mutantes de recombinación	44

	pág.
3.- Análisis molecular de los rearrreglos genéticos	47
A) Identificación de los rearrreglos genéticos	47
B) Análisis molecular de los plásmidos pRA111, pRA131, pRA115, pRA135, pRA116 y pRA136	51
<b>DISCUSION</b>	<b>64</b>
1.- Construcción de plásmidos	64
2.- Cuantificación de compatibilidad y frecuencia de rearrreglos genéticos	66
3.- Análisis molecular de los rearrreglos genéticos	69
4.- Otras consideraciones	74
<b>ANEXO MATEMATICO</b>	<b>76</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>78</b>

## INTRODUCCION

### 1.- Generalidades

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosomal generalmente circular cerrado, superhelicoidal, heredables, - con capacidad de replicación autónoma del cromosoma y cuyos pesos moleculares fluctúan en un rango de 1.5 a 300 megadaltones (Md). Las funciones para las cuales codifican los plásmidos son generalmente dispensables para la bacteria (1).

La existencia de plásmidos ha sido detectada en un gran número de bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas. La diversidad de plásmidos ha permitido que se puedan agrupar de acuerdo a ciertas características:

- a) Información genética. Como los plásmidos F (fertilidad), tipo Col (productores de colicinas), tipo R (resistencia a antibióticos), etc.. Sin embargo, esta clasificación no siempre es adecuada ya que con frecuencia se encuentran plásmidos mixtos: por ejemplo, plásmidos F con resistencia a antibióticos (1).
- b) Sistema de transferencia o movilización. Muchos plásmidos, generalmente grandes, tienen información genética para - transferir, por conjugación, una copia a otras bacterias, mientras que otros plásmidos, principalmente pequeños, - tienen la información para ser movilizados por un plásmido conjugativo. Se han descrito 6 sistemas diferentes de transferencia (F,N,X,I,P y W). La transferencia puede - efectuarse entre bacterias de la misma especie y en algunos casos entre bacterias de géneros diferentes (1).

- c) Sistema de replicación. De acuerdo a su sistema de replicación, se agrupan en plásmidos de control relajado (plásmidos multicopia) y de control estricto (plásmidos de bajo número de copias). La información genética para regular la replicación y el número de copias del plásmido en la célula, se encuentra principalmente en el mismo plásmido. Esta regulación está determinada por la presencia de secuencias de DNA necesarias en cis y moléculas efectoras (RNA y proteínas) que regulan el número de eventos de iniciación de la replicación. Para algunos plásmidos chicos se ha demostrado la producción de un RNA pequeño que inhibe el procesamiento del RNA iniciador para la replicación. En plásmidos grandes, hay un RNA pequeño que inhibe la transcripción de un mRNA, cuyo producto proteico modula positivamente la replicación. El sistema de replicación de un plásmido también está involucrado en el fenómeno de incompatibilidad (2,3,4,5,6).
- d) Incompatibilidad. La incompatibilidad se observa en bacterias que contienen dos plásmidos con sistemas similares de replicación. En este caso, esas bacterias, después de varias generaciones generan dos subpoblaciones, cada una conteniendo un sólo tipo de plásmido. La relación de las dos subpoblaciones varía de acuerdo a las características de los dos plásmidos. Por ejemplo, las células que inicialmente contienen a los plásmidos R100 y R1-19 del mismo grupo de incompatibilidad (IncFII), después de varias generaciones, generan una población bacteriana en la cual el 50% de las células tienen al R100 y el otro 50% al R1-19. Sin embargo, para el caso de otros plásmidos este porcentaje relativo puede variar.

La incompatibilidad se debe básicamente a la competencia entre dos plásmidos por la maquinaria de replicación o de segregación. Por ejemplo, para los plásmidos incompatibles ColE1 y pBR322, el RNA represor del pBR322 reprime más eficientemente al sistema de replicación del

ColE1 que a su propio sistema, produciendo un mayor número de copias del pBR322. En plásmidos de bajo número de copias (F, R100, R1-19), se ha descrito un sistema de segregación por unión a membrana, análogo a los centromeros de células eucarióticas. En este caso, la competencia de los plásmidos por los sitios de unión a membrana sería un factor de incompatibilidad. La incompatibilidad también puede generarse si existe un mecanismo que regule el número máximo de replicones similares dentro de una célula (3,4,5,6).

El DNA de los plásmidos al portar información genética generalmente no esencial, constituye un dominio genético sujeto a una presión selectiva diferente a la ejercida sobre la información cromosomal. Además, es frecuente que algunos genes presentes en plásmidos se localicen en transposones, los cuales son secuencias de DNA capaces de generar rearrreglos moleculares, como son: inversiones, duplicaciones, deleciones y fusión de replicones. Los rearrreglos moleculares entre plásmidos podrían generarse también por recombinación entre secuencias homólogas entre dos plásmidos.

La dinámica molecular de los plásmidos mediada por sistemas de recombinación que operan sobre secuencias homólogas o por sistemas que requieren de homología mínima (recombinación sitio-específica, transposición) proveen un proceso continuo de ensamble, disociación, rearrreglo e intercambio de secuencias de DNA entre plásmidos. Estos procesos contribuyen a la generación de nuevos plásmidos, muchos de los cuales son capaces de transferirse de una célula a otra. Estas propiedades de los plásmidos permiten considerarlos como una poza de unidades de información genética común a varios géneros y especies de bacterias.

## 2.- Recombinación homóloga en Escherichia coli.

La recombinación homóloga puede definirse como el in

tercambio de secuencias similares entre dos moléculas de DNA (recombinación intermolecular) o dentro de la misma molécula (recombinación intramolecular) (7).

Lederberg y Tatum en 1946, utilizando E. coli K-12, demostraron que los factores F integrados al cromosoma poseen la capacidad de transferir, por conjugación, DNA cromosomal a otra célula. Este evento produce células con regiones de DNA cromosomal diploides, en donde puede efectuarse la recombinación genética, denominada recombinación post-conjugacional (7,8).

Clark y Margulis en 1965 y Howard-Flanders y Theriot en 1966 aislaron mutantes con muy baja capacidad de formar recombinantes por conjugación, a las que denominaron recA. Las mutantes en recA son muy sensibles a luz ultravioleta y presentan una frecuencia de recombinación de  $1 \times 10^{-6}$  en relación a la cepa silvestre (8). Además, son muy sensibles a mutágenos como mitomicina C, metilmetano sulfonato, etc. y presentan una división celular aberrante (7,8,9,10).

El gene recA es regulado negativamente por el producto proteico del gene lexA. In vitro, la proteína RecA en presencia de oligonucleótidos, posee actividad de proteasa hacia su represor LexA. Se ha observado que la proteína LexA también reprime a otros genes que están involucrados con el sistema SOS y de reparación del DNA, como son, dinA, dinB, dinD, dinF, hima, sfiA, umuC, uvrA y uvrB (11,12,13).

La proteína RecA es un polipéptido de 38,000 daltones, con un punto isoeléctrico de 6.0. Esta proteína tiene - las siguientes propiedades: a) se une a DNA de hebra sencilla, b) transfiere DNA de hebra sencilla a DNA homólogo de doble hebra (DNA-duplex), c) hidroliza ATP en presencia de DNA, d) funciona como topoisomerasa en presencia de ATP y e) presenta actividad de proteasa (7,12,13,14,15,16,17).

Las mutaciones en los genes recB y recC, que mapean en un sitio diferente al de recA, afectan también la recombi-

nación post-conjugacional. Estas mutaciones inducen una disminución en la frecuencia de recombinación ( $1 \times 10^{-2}$ ) menor a la inducida por recA<sup>-</sup>. El producto de los genes recB y recC es una exonucleasa tipo V de 270,000 daltones, constituida por dos subunidades. Las actividades de esta enzima son: a) endonucleasa de DNA de hebra sencilla, b) endonucleasa de una sola hebra en DNA duplex dependiente de la secuencia "chi" (5'-GCTGGTGG-3'), c) exonucleasa de DNA de hebra sencilla o doble hebra, d) topoisomerasa de DNA duplex y e) actividad de ATPasa (9,10,18,19,20).

Los resultados obtenidos con dobles y triples mutantes en los genes recA, recB y recC, indican que estos genes pertenecen a un mismo sistema de recombinación (vía RecBC), que es el principal en las cepas silvestres (9,10).

Por tratamientos mutagénicos de las cepas recB<sup>-</sup> recC<sup>-</sup>, se han podido aislar cepas revertantes resistentes a luz ultravioleta que tienen una frecuencia de recombinación similar a la cepa silvestre. La mayoría de las mutantes encontradas tienen una segunda mutación que suprime el efecto de la mutación recB<sup>-</sup> y/o recC<sup>-</sup>. Esta segunda mutación se localiza en el gene sbcA o en el sbcB. La reversión en las mutantes sbcA<sup>-</sup>, es el resultado de la inactivación del represor del gene recE, que codifica para una exonucleasa tipo VIII. Esta exonucleasa degrada DNA de hebra sencilla o doble hebra y se piensa que puede sustituir algunas funciones realizadas por la proteína -- RecBC. Esta vía de recombinación, denominada RecE, recombina eficientemente al fago lambda en ausencia de RecA y de las proteínas de recombinación de lambda. Sin embargo, para la recombinación post-conjugacional depende de RecA (9,10,21).

Las mutaciones en el gene sbcB producen la desaparición de la actividad de una exonucleasa tipo I. Esta exonucleasa degrada DNA de hebra sencilla a partir del extremo 3'-OH terminal. El descubrimiento de estas mutantes en cepas que tenían deletado del gene recE y el hecho de que mutaciones en los genes recF, recL, recQ y recK sólo afectan la recombinación

de esta vía y no la vía RecBC, ayudan a postular la existencia de una vía alternativa de recombinación, llamada RecF (9,10,22,23,24,25).

Se ha reportado que la frecuencia de recombinación en las cepas recB<sup>-</sup>recC<sup>-</sup>sbcA<sup>-</sup> (vía RecE) disminuye 10 veces -- cuando el gene recF es mutado. Este resultado sugiere que só lo hay dos vías de recombinación en E. coli (Figura 1). El modelo actual para la recombinación en E. coli propone la existencia de tres intermediarios hipotéticos dependientes de RecA. La generación de uno de estos intermediarios requiere además de la actividad de la exonucleasa VIII (sbcA). Los productos finales de la recombinación son producidos por las proteínas RecBC ó RecF (10,26).

Una diferencia importante entre las dos vías de recombinación es que la vía RecBC depende de la secuencia "chi", que se encuentra una cada 5 a 10 Kpb en el cromosoma de -- E. coli, mientras que la vía RecF reconoce otras secuencias, denominadas "fre", de las cuales sólo se han encontrado 3 en el cromosoma de E. coli y otras en las secuencias de inserción IS<sub>2</sub> e IS<sub>3</sub> (18,19,27,28).

### 3.- Mecanismos moleculares de recombinación homóloga.

Todos los modelos de recombinación (7,29,30,31), - proponen la formación de moléculas intermediarias dinámicas con regiones híbridas (heteroduplex) formadas por una hebra de ca da una de las moléculas que recombinan. La molécula final re combinante es el resultado no sólo de la recombinación, sino de la replicación y reparación de esa molécula híbrida. Los datos obtenidos con las proteínas RecA y RecBC permiten propo ner un modelo de recombinación para la vía RecBC (Figura 2). En este modelo la proteína RecA se une y acerca a las regiones homólogas de DNA, la enzima RecBC primero desenrolla al DNA duplex y posteriormente rompe el enlace fosfodiéster en una de las hebras del DNA duplex, cerca de la secuencia "chi". La región de DNA de cadena sencilla, con ayuda de las proteínas

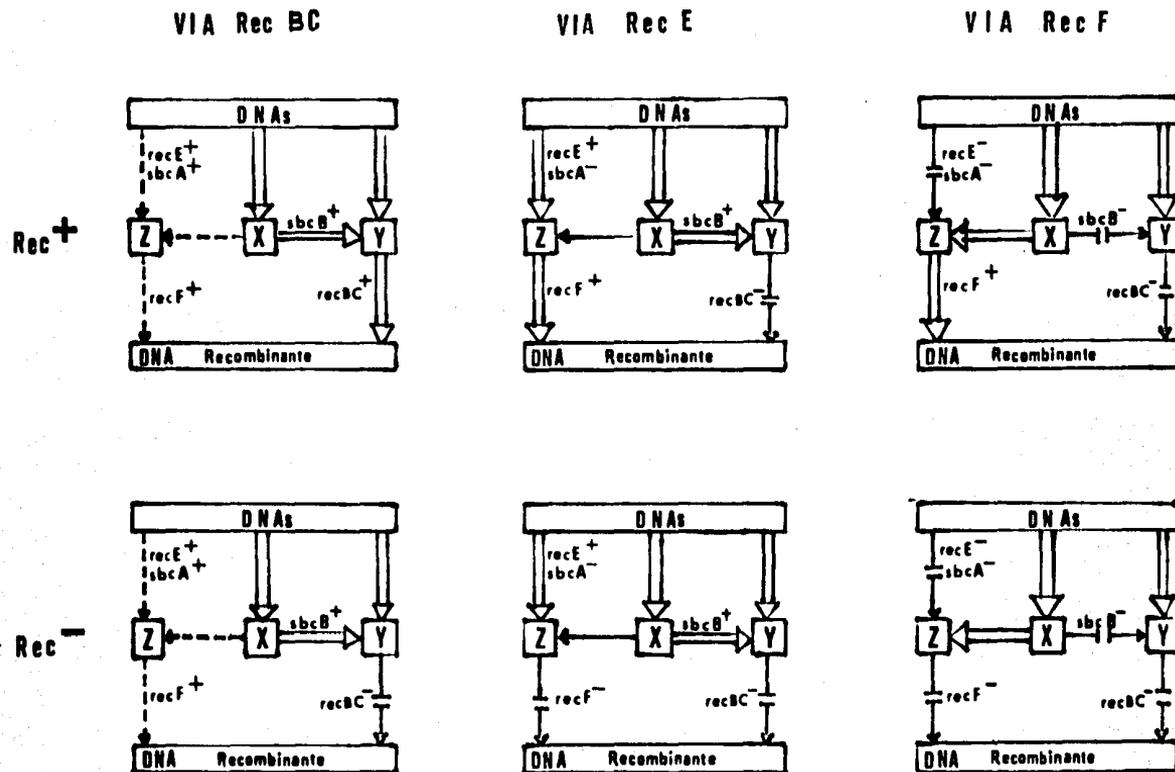


Figura 1.- Diagrama esquemático de las vías de recombinación en *E. coli* K-12 descritas por Clark, A.J. (10) y Gillen, J.R. (23). DNAs indica las dos moléculas con regiones homólogas, las cuales en presencia de la proteína RecA generan los intermediarios hipotéticos X y Y, mientras que el intermediario Z se genera en presencia de las proteínas RecA y RecE. El intermediario X, es procesado a los intermediarios Z ó Y que son sustrato de las enzimas RecF ó RecBC, respectivamente, generando los productos finales de recombinación homóloga.

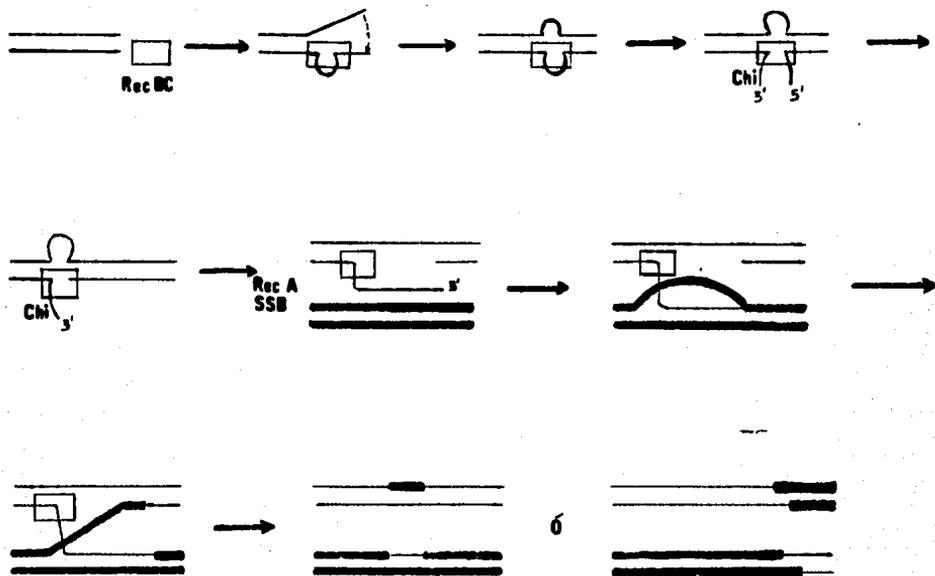


Figura 2.- Modelo del mecanismo enzimático de recombinación para la vía RecBC, descrito por Taylor, A.F., et al (19). En este modelo se postula que la enzima RecBC reconoce un DNA lineal que desenrolla a partir del extremo 3'-OH terminal en relación a la secuencia "chi" y después rompe el enlace fosfodiéster en una sola hebra de DNA cerca del 3'-OH terminal de la secuencia "chi". Posteriormente las actividades enzimáticas de las proteínas RecA y SSB producen que la hebra sencilla pueda invadir a una molécula de DNA duplex homóloga, para formar un heteroduplex que posteriormente es procesado para generar las moléculas recombinantes finales.

RecA y SSB (proteína que se une a DNA de hebra sencilla), invade al DNA duplex homólogo para realizar el intercambio de hebras. Este evento genera las estructuras de desplazamiento denominadas "asa-D". En el caso de la recombinación entre dos moléculas circular cerradas (plásmidos), las figuras de ocho que se observan al microscopio electrónico se generan por cortes de hebra sencilla en cada una de las moléculas y unión cruzada de las cadenas cortadas (16,17,19).

#### 4.- Recombinación sitio-específica y transposición.

En la recombinación sitio-específica, el intercambio se lleva a cabo entre dos moléculas de DNA que tienen un pequeño número de bases homólogas flanqueadas por secuencias extensas no homólogas. Esta recombinación no requiere de la proteína RecA, sino de una recombinasa específica para la secuencia homóloga. La integración del fago lambda al cromosoma de E. coli, el cambio de fase en Salmonella typhimurium y la resolución de cointegrados formados por el Tn<sub>3</sub>, son ejemplos de este tipo de recombinación (33).

Otro evento molecular, independiente de RecA, capaz de inducir rearrreglos moleculares en el DNA, es la transposición de los elementos genéticos móviles. Un elemento genético móvil es una secuencia de DNA flanqueada por secuencias invertidas y repetidas capaz de insertarse o de insertar una copia de ella a otra región de la molécula de DNA donde se localiza, o bien a una molécula vecina de DNA. La transposición requiere de homología mínima entre el elemento genético móvil y el sitio al que transpone y de una enzima específica o transposonasa codificada por el propio elemento genético móvil, - que induce la duplicación de un número pequeño de pares de bases originalmente presentes en la secuencia blanco. La presencia de un elemento móvil puede inducir la inversión, duplicación o pérdida de genes vecinos así como la fusión de replicones (32).

Además de la recombinación sitio-específica y de la transposición, puede presentarse recombinación, también in dependiente de RecA entre secuencias homólogas pequeñas. En este caso se desconocen las enzimas responsables. En general, la transposición y la recombinación recA-independiente entre secuencias homólogas pequeñas son eventos menos frecuentes que los eventos de recombinación mediados por la proteína RecA y que involucran secuencias homólogas extensas.

#### 5.- Recombinación homóloga de plásmidos.

En los últimos años, los plásmidos pequeños, principalmente tipo ColE1, han sido utilizados de manera intensiva para estudiar la recombinación de DNA homólogo. Los plásmidos constituyen un modelo experimental que ofrece la posibilidad de observar al microscopio electrónico a las moléculas intermedias de la recombinación, aislar y caracterizar un número grande de moléculas recombinantes. Se han descrito varios métodos para estudiar la recombinación homóloga utilizando a los plásmidos como sustrato de la maquinaria de recombinación de la bacteria: a) observación por microscopía electrónica de los productos intermedios, como son las estructuras de "asa-D", las figuras de ocho y "X", b) Formación de moléculas oligoméricas a partir de moléculas monoméricas (recombinación interplásmido) ó aparición de monómeros de plásmido a partir de un oligomero (recombinación intraplásmido) y c) reconstitución de un marcador genético, teniendo como sustrato a plásmidos con el mismo gene pero mutado en diferentes sitios (33,34,35,36).

Usando estos métodos se demostró que la recombinación entre plásmidos chicos es diferente a la recombinación del cro mosoma con fragmentos de DNA introducidos por conjugación media da por Hfr o por transducción. Esta diferencia se observa al comparar la frecuencia de recombinación post-conjugacional con la recombinación de plásmidos chicos cuando se utilizan diferentes mutantes en recombinación (Tabla 1) (37).

Tabla 1.- Frecuencia de recombinación plásmidica y post-conjugacional en diferentes mutantes en recombinación de E. coli.<sup>a</sup>

Genotipo relevante (cepa representativa)	Frecuencia de recombinación relativa		
	intraplásmido	interplásmido	post-conjugacional
<u>rec</u> <sup>+</sup> (AB1157)	1.0	1.0	1.0
<u>recA</u> <sup>-</sup> (JC2926)	$1.0 \times 10^{-2}$	$2.7 \times 10^{-2}$	$10^{-5}$
<u>recB</u> <sup>-</sup> <u>recC</u> <sup>-</sup> (JC5519)	1.0	1.0	$10^{-2}$
<u>recF</u> <sup>-</sup> (JC9239)	$2.6 \times 10^{-2}$	$2.7 \times 10^{-2}$	1.0
<u>sbcB</u> <sup>-</sup> (JC11451)	1.0	1.0	1.0
<u>recB</u> <sup>-</sup> <u>sbcA</u> <sup>-</sup> (JC5183)	32	4.8	0.5
<u>recA</u> <sup>-</sup> <u>recB</u> <sup>-</sup> <u>sbcA</u> <sup>-</sup> (DR107)	33	0.13	$10^{-5}$

a) Cohen, A., et. al. (37)

Las principales conclusiones mostradas en la Tabla 1 son: a) las mutaciones en el gene recA afectan más la recombinación post-conjugacional, que la recombinación plasmídica ( $10^{-5}$  y  $10^{-2}$ , respectivamente). El decremento de la recombinación plasmídica, correlaciona con una menor frecuencia en la formación de las estructuras "X" y figuras de ocho, b) inactivación de la exonucleasa V (recB<sup>-</sup> y/o recC<sup>-</sup>) sólo afecta la recombinación post-conjugacional, c) mutaciones en el gene recF, producen una disminución en la recombinación plasmídica (200 veces), similar a la encontrada en mutantes recA<sup>-</sup>; sin embargo, la recombinación post-conjugacional no se afecta, d) en las cepas recB<sup>-</sup>recC<sup>-</sup>sbcA<sup>-</sup> (vía RecE), la frecuencia de recombinación post-conjugacional es similar a la de las cepas silvestres. Sin embargo, la recombinación intraplásmido es de 33 veces mayor que la de la cepa silvestre y la recombinación interplásmido es de 4.8 veces mayor que la de la cepa silvestre, e) la inactivación del gene recA en las cepas recB<sup>-</sup>recC<sup>-</sup>sbcA<sup>-</sup> (vía RecE, en condiciones recA<sup>-</sup>) produce una marcada disminución en la recombinación post-conjugacional ( $10^{-5}$ ) y tiene un efecto diferente sobre la recombinación interplásmido y la intraplásmido. La primera disminuye sólo 10 veces en relación a lo encontrado en la cepa silvestre y 37 veces en relación a la cepa recB<sup>-</sup>recC<sup>-</sup>sbcA<sup>-</sup> (vía RecE, en condiciones recA<sup>+</sup>); mientras que la recombinación intraplásmido se mantiene elevada (33 veces) en relación a la cepa silvestre, pero igual a la cepa recB<sup>-</sup>recC<sup>-</sup>sbcA<sup>-</sup>.

En resumen podemos decir que en E. coli, la recombinación post-conjugacional se realiza principalmente por la vía RecBC y la recombinación de plásmidos chicos por las vías RecF y RecE. Esta diferente dependencia de la recombinación post-conjugacional y plasmídica por las vías de recombinación, podría deberse a la presencia o ausencia de secuencias específicas para cada vía en los DNA a recombinar y a la estructura molecular de los sustratos (DNA lineal, superenrollado, etc.). Por ejemplo, en E. coli el cromosoma tiene de 400 a 800 secuencias "chi" y solamente tres secuencias "fre", mientras que los

plásmidos tipo ColE1 no tienen secuencias "chi". En ColE1 se encontró una secuencia denominada cer que actúa como sitio específico de recombinación para la resolución de multímeros de este plásmido en cepas silvestres de E. coli; sin embargo, se desconoce la enzima responsable de esta recombinación. En el cromosoma de E. coli existen además secuencias, que clonadas en plásmidos tipo ColE1, incrementan la frecuencia de recombinación de estos plásmidos. Estas secuencias recombinogénicas - son de dos clases, unas que actúan en cis y otras en trans(38).

La recombinación de plásmidos grandes es un fenómeno más complejo, ya que en este caso, muchos de los plásmidos codifican proteínas que pueden modificar la eficiencia y/o especificidad de las enzimas de recombinación codificadas por el cromosoma. Por ejemplo: a) el plásmido F, incrementa la frecuencia de recombinación post-conjugacional en cepas silvestres de E. coli, así como la frecuencia de excisión precisa de los transposones Tn5 y Tn10 estimulada por el gene ferA y la recombinación entre dos IS3 estimulada por el gene ferB en presencia de RecA (39), y b) el plásmido R1-19, que tiene regiones homólogas con el plásmido F, provoca diferentes efectos en diferentes mutantes en recombinación; b.1) disminuye la frecuencia de recombinación post-conjugacional en cepas silvestres y en cepas recF<sup>-</sup>, recL<sup>-</sup>, y recB<sup>-</sup>recC<sup>-</sup>sbcA<sup>-</sup>, b.2) no produce efecto en la cepa recB<sup>-</sup>sbcB<sup>-</sup> y b.3) incrementa la frecuencia de recombinación post-conjugacional en las cepas recA<sup>-</sup>, recB<sup>-</sup>recC<sup>-</sup>sbcB<sup>-</sup>recF<sup>-</sup> y recB<sup>-</sup>recC<sup>-</sup>sbcB<sup>-</sup>recL<sup>-</sup>. El incremento o disminución en la recombinación está estrechamente relacionado con un aumento o disminución en la resistencia a luz ultravioleta. Se piensa que estos efectos son producidos por una exonucleasa ATP-dependiente codificada por el plásmido R1-19 (40).

#### 6.- Rearreglos moleculares en plásmidos R del grupo de incompatibilidad FII.

Los plásmidos R1-19 y R100 del grupo de incompatibilidad FII, son un ejemplo claro de la dinámica molecular de los

plásmidos. Estos plásmidos de 55 a 63 megadaltones (Md) están constituidos por dos unidades genéticas de información funcionalmente diferentes, flanqueadas por secuencias de inserción IS1 en forma de repetidas directas: el factor de transferencia (RTF) y el determinante de resistencia (r-det) (Figura 3). El RTF posee la información genética para la transferencia, replicación y propiedades de incompatibilidad del plásmido y el r-det porta la mayoría de los genes que confieren la resistencia a varios antibióticos. El r-det del plásmido R1-19 contiene al gene de resistencia a cloramfenicol y tres transposones: Tn3 (resistencia a ampicilina), Tn4 (resistencia a ampicilina, estreptomicina-espectinomicina y sulfonamida) y Tn2350 (resistencia a kanamicina). El r-det del R100 tiene al gene de resistencia a cloramfenicol y al transposón Tn21 que contiene la resistencia a iones mercurio, estreptomicina-espectinomicina y sulfonamida; además en el RTF de este mismo plásmido se encuentra el Tn10 (resistencia a tetraciclina) (41,42,43). Aunque el R1-19 fué aislado en Inglaterra y el R100 en Japón, el estudio comparativo de su estructura molecular sugiere la existencia de un plásmido precursor común.

Estos dos plásmidos han sido utilizados por diferentes grupos de investigadores como modelo experimental para el estudio de los mecanismos moleculares de ensamble y disociación de unidades de información en diferentes sistemas bacterianos, así como para el estudio de la dinámica de la evolución de los plásmidos.

Los rearrreglos moleculares que más se han estudiado en estos plásmidos, son generados por recombinación homóloga intra e intermoleculares.

#### A) Rearreglos intramoleculares

Los rearrreglos intramoleculares encontrados para los plásmidos R1-19 y R100 son: a) en Proteus mirabilis, en presencia de altas concentraciones del antibiótico cloramfenicol, es

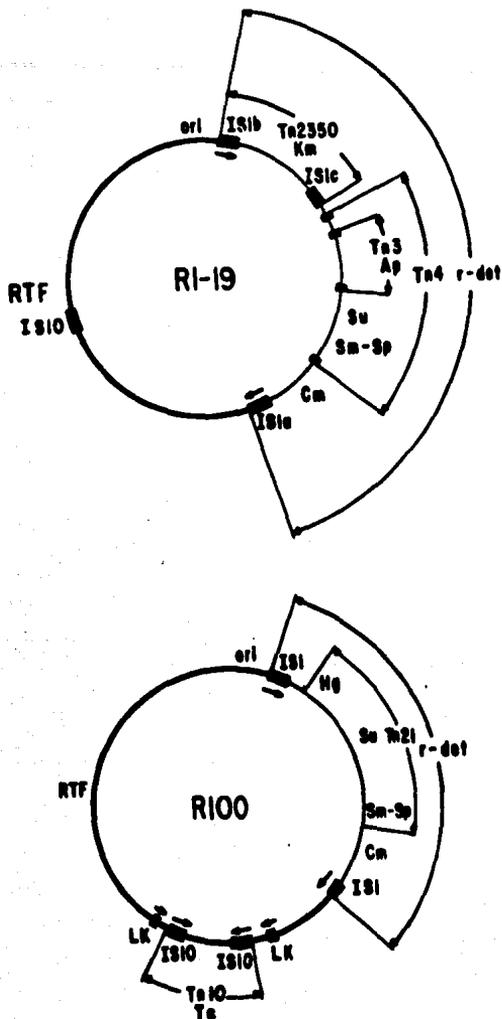


Figura 3.- Mapa genético de los plásmidos R1-19 y R100. Tomado de Clerget, M. et al (41) y Tanaka, N. et al (43).

posible seleccionar plásmidos constituidos por varios r-det en tandem (5 a 7 copias) unidos a un RTF. Las copias de r-det pueden recombinar para formar círculos cerrados de r-det (CCC r-det) incapaces de replicarse autónomamente. La amplificación del r-det, así como la formación de CCC r-det, son eventos producidos por recombinación homóloga entre las secuencias repetidas IS<sub>1</sub> (44), b) en Salmonella typhimurium, el -- plásmido R100 se disocia en dos moléculas circulares cerradas: el r-det y el RTF. La molécula de r-det es incapaz de replicarse, produciéndose así bacterias que retienen únicamente a la molécula de RTF. La disociación del R100 se realiza por recombinación homóloga entre las IS<sub>1</sub> y depende de los genes recA y dor (45), c) en E. coli, estos plásmidos son muy estables; sin embargo, en cepas en donde el plásmido se integra al cromosoma para suprimir una mutación que afecta la replicación del cromosoma, se ha podido observar la producción de CCC r-det. Por otro lado, en una cepa hiperrecombinante de E. coli, el R100 pierde el r-det por recombinación homóloga entre las IS<sub>1</sub>, de manera similar a lo que sucede en S. typhimurium (46).

Recientemente se ha descrito un plásmido derivado del R100, el cual perdió una región del r-det, y que es capaz de generar moléculas de CCC r-det y plásmidos que tienen varias copias de r-det en tandem unidas al RTF (47). Estos eventos también dependen de la secuencia de inserción IS<sub>1</sub> y son observados en P. mirabilis, S. typhimurium y E. coli. La amplificación y la disociación del r-det de este plásmido en E. coli, es afectada por mutaciones en los genes de recombinación homóloga recA, recB y recF.

#### B) Rearreglos intermoleculares.

La formación de rearreglos entre dos plásmidos, pueden ser eventos independientes ó dependientes del gene recA. Los primeros generalmente se realizan por transposones y/o secuencias de inserción, mientras que el segundo requiere de -- RecA y de una región grande de homología entre las dos secuen-

cias de DNA.

Uno de los eventos moleculares que se realizan entre dos plásmidos, es la fusión de moléculas ó formación de cointegrados. Trabajos realizados con el plásmido NR1 (R100) y plásmidos derivados del ColE1 conteniendo fragmentos de DNA del plásmido NR1, ha revelado que la frecuencia de formación de cointegrados está directamente relacionada con la longitud del DNA homólogo y de la proteína RecA. La presencia de la secuencia IS1 en el DNA homólogo parece no afectar la frecuencia de formación de cointegrados (48).

Una diferencia importante entre los rearrreglos intramoleculares e intermoleculares en los plásmidos tipo R1-19 y R100, es que en los primeros la recombinación se efectúa entre las secuencias de inserción IS1, mientras que las segundas dependen de la homología entre los DNAs pero no de una secuencia específica.

## OBJETIVOS

La dinámica molecular de los plásmidos ejemplificada por los plásmidos R1-19 y R100 mediada por recombinación legítima (homóloga) o recombinación ilegítima (transposición), desempeña un papel importante en la generación de nuevos plásmidos. De los eventos moleculares encontrados en el R1-19 y R100 el de mayor interés y más estudiado es la recombinación homóloga entre las secuencias IS<sub>1</sub> que flanquean el r-det. La estructura molecular de las moléculas generadas por recombinación entre las IS<sub>1</sub> depende de los sistemas de recombinación de la bacteria y son de 3 tipos: a) CCC r-det, b) RTF y c) un RTF unido a varios r-det en tandem. Estas moléculas generadas por el R100 y R1-19, sugieren que estos plásmidos están constituidos por dos unidades genéticas diferentes, el r-det y el RTF, que en alguna etapa evolutiva se unieron. Por otro lado, se ha reportado que la recombinación post-conjugacional y la recombinación de plásmidos chicos, presentan dependencias diferentes a los sistemas de recombinación de E. coli.

En base a los antecedentes anteriores se planteó: estudiar la dinámica molecular de plásmidos tipo R en diferentes sistemas de recombinación, así como el tipo de rearrreglos genéticos y su frecuencia con la cual ocurren en células que contienen dos plásmidos tipo R del mismo grupo de incompatibilidad. Como objetivos particulares; a) obtener nuevos plásmidos generados por rearrreglos genéticos entre plásmidos tipo R1-19 y R100, b) conocer cuáles rearrreglos moleculares entre estos dos plásmidos son más frecuentes en los diferentes sistemas de recombinación de E. coli, c) estudiar si los rearrreglos moleculares se generaron por recombinación homóloga entre las IS<sub>1</sub> ó por otro tipo de evento, y d) obtener la frecuencia de recombinación entre plásmidos tipo R1-19 y R100 en diferentes cepas mutantes en recombinación.

## MATERIALES Y METODOS

### 1.- Cepas, plásmidos y medios de cultivo.

Las cepas de *E. coli* y los plásmidos utilizados en este trabajo se enumeran en la Tabla 2.

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio Luria ó Mc Conkey. A estos medios en algunos casos se les agregó uno ó más antibióticos. Los antibióticos usados y sus concentraciones fueron las siguientes: estreptomycin (Sm) 50 ó 400 µg/ml, espectinomycin (Sp) 50 µg/ml, tetraciclina (Tc) 30 µg/ml, cloramfenicol (Cm) 30 µg/ml, kanamicina (Km) 30 µg/ml, ácido nalidixico (Nal) 30 µg/ml, y sulfametoxazol (Su) 100 µg/ml. Cuando se utilizó cloruro de mercurio (Mer), su concentración fué de 40 µg/ml.

### 2.- Sensibilidad celular a luz ultravioleta.

El método empleado fué descrito por Horii y Clark (49). Las células se crecieron en Luria hasta la fase exponencial (D.O. a 550nm, 0.5), se lavaron en medio de dilución (MgSO<sub>4</sub> 0.25%) y se resuspendieron hasta obtener la densidad óptica original. Una muestra de 3 ml de células se colocó en una caja de Petri de 10 cm de diámetro y se irradió a 25 cm - de la lámpara de luz ultravioleta (Mineralight lamp, que emite principalmente longitud de onda a 254 nm). Las células se irradiaron a diferentes tiempos, se diluyeron, se sembraron en medio Luria y se incubaron a 37°C en la oscuridad.

### 3.- Sensibilidad celular a nitrofurantoina.

La sensibilidad a nitrofurantoina se realizó por el método descrito por Jenkins y Bennett (50). Las células se -

Tabla 2.- Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa ó Plásmido	Genotipo ó Fenotipo relevante	Referencia ó origen
C600 Nal <sup>r</sup>	<u>thi<sup>-</sup> leu<sup>-</sup> lac<sup>-</sup></u> Nal <sup>r</sup>	C. Miller
W3110	F <sup>-</sup> Prototrofa	E. coli genetic stock center
GM33	igual que W3110, pero <u>dam-3</u>	(60)
NK5661	igual que W3110, pero <u>lacZ2900::Tn10</u>	N. Klecker
MX902	<u>thi<sup>-</sup> ilv<sup>-</sup> Δ (pro-lac) glnG74::Tn5</u>	F. Bastarrachea
MX881 Nal <sup>r</sup>	<u>thi<sup>-</sup> ilv<sup>-</sup> Δ (pro-lac) recA56</u> Nal <sup>r</sup>	F. Bastarrachea
AB1157	Δ ( <u>sbcA-recE</u> )	A. J. Clark
JC2924	igual que AB1157, pero <u>recA56</u>	A. J. Clark
JC7623	igual que AB1157, pero <u>recB21 recC22 sbcB15</u>	A. J. Clark
JC9604	<u>recA56 recB21 recC22 sbcA23</u>	A. J. Clark
pRT29	Tc <sup>r</sup>	(58)
pER322::IS1	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	M. Chandler
R1-19	Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> -Sp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	G. Alfaro
RIF	derivado del R1-19, pero deletado del r-det (Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> -Sp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> )	este trabajo
pRIF-1	derivado del RIF, con Tn5 (Km <sup>r</sup> )	este trabajo
pRIF-2	derivado del pRIF-1, con Tn10 (Tc <sup>r</sup> )	este trabajo
R100	Mer <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> -Sp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	G. Alfaro
pR100-T	igual que R100, pero Tc <sup>s</sup>	este trabajo
pRA111	Mer <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> -Sp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	este trabajo
pRA115	derivado del pRA111, pero Km <sup>s</sup> Tc <sup>s</sup>	este trabajo
pRA116	derivado del pRA111, pero Mer <sup>s</sup> Su <sup>s</sup> Sm <sup>s</sup> -Sp <sup>s</sup> Cm <sup>s</sup>	este trabajo
pRA131	Mer <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> -Sp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	este trabajo
pRA135	derivado del pRA131, pero Km <sup>s</sup> Tc <sup>s</sup>	este trabajo
pRA136	derivado del pRA131, pero Mer <sup>s</sup> Su <sup>s</sup> Sm <sup>s</sup> -Sp <sup>s</sup> Cm <sup>s</sup>	este trabajo

crecieron hasta la fase exponencial ( D.O. a 550 nm, 0.5), se lavaron y se resuspendieron en medio de dilución hasta obtener la densidad óptica original. Posteriormente se diluyeron y se sembraron en medio Luria conteniendo diferentes concentraciones de nitrofurantoina.

#### 4.- Conjugación bacterina.

Para las conjugaciones se mezclaron los cultivos en la fase exponencial de las cepas donadora y receptora en una relación 1:5 ó 1:10 respectivamente, como describe Miller, J.H. (51). La mezcla se incubó a 37°C por 1 hr, 2 hrs o 8 hrs y se sembraron en medio selectivo. En el caso de conjugaciones triples, dos con plásmido y una sin plásmido, los cultivos se mezclaron en proporción 1:1:5, respectivamente o en el caso de una cepa con plásmido y dos sin plásmido, los cultivos se mezclaron en proporción 1:5:5, respectivamente, los cultivos se incubaron por 8 hrs a 37°C y posteriormente se sembraron en el medio selectivo.

#### 5.- Obtención de lisados claros.

Para el aislamiento del DNA plasmídico, se utilizó el método de lisados claros alcalinos descrito por Maniatis, T., et al (52). El método se extrapoló a un volumen de 20 ml de cultivo y las centrifugaciones se realizaron en la centrifuga Sorval RC-5.

#### 6.- Purificación de plásmidos.

La purificación de plásmidos chicos ó grandes se realizó por medio de una lisis celular con alcali y SDS y gradientes de CsCl-bromuro de etidio (BrEt) (52). Las bandas de DNA se observaron con luz ultravioleta (UV) y se extrajo la banda inferior (DNA superenrollado) por punción lateral. Al DNA -

se le removió el BrEt por medio de una columna de intercambio iónico (Dowex AG 50W-X8 de Bio-Rad), se dializó, se concentró y se trató con bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) como describe Bellamy y Ralph (53), para eliminar impurezas.

#### 7.- Electroforesis en geles de agarosa.

Las electroforesis se realizaron en geles verticales en placas con dimensiones de 18 x 14 x 0.15 cm ó 22 x 16 x 0.15 cm. Se utilizó agarosa al 1.0% en amortiguador de acetatos (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, acetato de sodio 20 mM, NaCl 18 mM, pH 8.15). La electroforesis se efectuó a voltaje constante - de 50 Volts por 4 a 10 hrs.

Los geles se observaron y se fotografiaron con luz ultravioleta después de teñirlos con BrEt a una concentración de 10 µg/ml.

En algunas electroforesis se utilizaron como controles de peso molecular fragmentos de DNA del bacteriófago -- lambda digerido con las enzimas de restricción EcoRI, SalI y BglII.

#### 8.- Digestión con enzimas de restricción.

Las endonucleasas de restricción usadas fueron: --- EcoRI, SalI, BglII, HincII, PvuII y EcoRII de P.L. Biochemicals, Inc.. Las reacciones se efectuaron en un volumen final de 50 a 200 µl en el amortiguador y temperatura recomendado - por los proveedores. La reacción se detuvo con una extracción de fenol-cloroformo como describe Maniatis, T., et al (52).

#### 9.- Selección de células con rearrreglos genéticos entre los plásmidos pRTF-2 y pR100-T.

La estrategia experimental para la selección de células con plásmidos con rearrreglos genéticos entre los plásmi-

dos pRTF-2 y pR100-T, se basó en la coexistencia transitoria de los dos plásmidos dentro de una bacteria. La incompatibilidad entre estos dos plásmidos permite este fenómeno y obtener células con un sólo plásmido.

El desarrollo experimental fue el siguiente: se realizó una conjugación múltiple entre las cepas W3110/pRTF-2, -W3110/pR100-T y la cepa receptora de los dos plásmidos (AB1157, JC2924, JC7623, y JC9604). Los cultivos en la fase exponencial temprana se mezclaron, se incubaron y se sembraron en el medio selectivo Mc Conkey con Sm, Tc, Km y Cm (MDR). Cinco colonias exconjugantes (cepa receptora con los dos plásmidos) se resuspendieron en 1 ml de medio Luria líquido con Sm, Tc, Km y Cm (L-MDR). La mitad (0.5 ml) del cultivo resuspendido se siguió creciendo en medio L-MDR hasta completar 30-35 doblajes celulares. Posteriormente las células se crecieron en medio Luria por 70-90 doblajes celulares. Las células se mantuvieron -- siempre en la fase exponencial, realizándose para ello diluciones seriadas decrecientes en el medio de crecimiento. A diferentes tiempos del experimento, una muestra del cultivo se sembró en medio Luria sólido conteniendo uno ó más antibióticos, los cuales son: Cm; CmTc; CmKm; TcKm; y MDR.

#### 10.- Hibridización DNA:DNA en filtros de nitrocelulosa (Southern).

Después de la electroforesis y tinción del gel con BrEt, el DNA del gel se transfirió a filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schull). El gel se trató previamente de la manera siguiente: 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 y 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 100 rpm. El gel se colocó entre dos filtros de nitrocelulosa como describe Maniatis, T., et al (52).

La prehibridización e hibridización se realizó como reportó Grunstein & Hogness (54), utilizando el siguiente amortiguador: 50% de formamida (Bio-Rad), 5X SSC, 0.1% de SDS, -- 1 mM de EDTA, 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1X de solución Denhard y 416 ug/ml de DNA de timo desnaturalizado. Los fragmentos de DNA utilizados como monitores se marcaron con --- [ $\gamma$ - $^{32}$ P]- ATP utilizando el sistema de "Nick-translation" que describe Maniatis, T. et al (52). Después de la hibridización el filtro se lavó y se colocó en placas para rayos X Kodak X-Omat K para autorradiografía. Los monitores usados fueron: el fragmento de HincII de 1275 pb del plásmido pRT29 ( gene tet del Tn10) y el fragmento de PvuII/EcoRII de 578 pb del - pBR322::IS1 (fragmento de IS1).

## RESULTADOS

### 1.- Obtención y caracterización de los plásmidos pRTF-2 y pR100-T

Para la selección de cepas con plásmidos con rearrreglos genéticos se obtuvieron dos plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad (IncFII) con marcadores de resistencia a antibióticos diferentes. Los marcadores diferentes permite diferenciarlos, mientras que el ser del mismo grupo de incompatibilidad asegura que, después de un periodo corto de coexistencia en la misma célula, los dos plásmidos se segregan. Uno de los plásmidos contiene únicamente a la región RTF (pRTF-2) y el otro a la región RTF y r-det (pR100-T).

#### A) Plásmido pRTF-2

La construcción del plásmido pRTF-2 se realizó de la manera siguiente: a) al plásmido R1-19 se le deletó toda la región de resistencia (r-det) por recombinación homóloga entre las IS<sub>1</sub>, en la cepa hiperrecombinante GM33 (55). b) Al RTF se le insertó por transposición el Tn<sub>5</sub> (Km<sup>r</sup>); este nuevo plásmido se denominó pRTF-1. La transposición se realizó por una conjugación múltiple, utilizando las cepas GM33/RTF, MX881 (glnG::Tn<sub>5</sub>) y C600 Nal<sup>r</sup>, y se seleccionó para las colonias C600/pRTF-1 (Nal<sup>r</sup> Km<sup>r</sup>). c) El plásmido pRTF-1 se transfirió por conjugación a la cepa NK5661 (lacZ::Tn<sub>10</sub>). Para obtener un plásmido pRTF-1 con el Tn<sub>10</sub>, se realizó una conjugación entre las cepas NK5661/pRTF-1 y C600 Nal<sup>r</sup> y se seleccionaron colonias resistentes a Nal, Km, y Tc (C600 Nal<sup>r</sup>/pRTF-1::Tn<sub>10</sub>). Este RTF con los dos transposones, se denominó pRTF-2.

Los plásmidos RTF, pRTF-1 y pRTF-2, se purificaron por gradientes de CsCl-BrEt y se analizaron con las enzimas de restricción EcoRI y SalI (Figura 4). La Figura 5 muestra los pesos moleculares de las bandas observadas en el patrón de reg

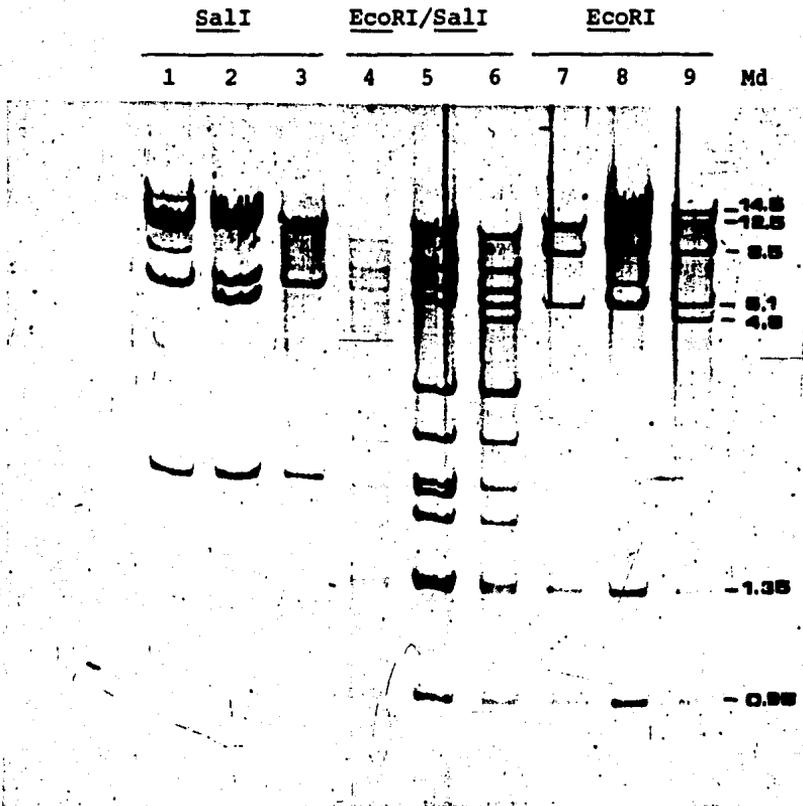
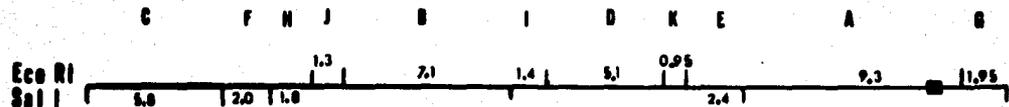


Figura 4.- Patrón de restricción de los plásmidos RTF (carriles 1,4,7), pRTF-1 (carriles 2,5,8) y pRTF-2 ( carriles 3,6,9) con las enzimas EcoRI, SalI y la doble digestión EcoRI/SalI.

SAL I			SAL I/EcoRI			EcoRI		
RTF	pRTF-1	pRTF-2	RTF	pRTF-1	pRTF-2	RTF	pRTF-1	pRTF-2
--	--	A1(11.45)	--	A1(9.95)	A1(9.95)	--	A1(14.5)	A1(14.5)
A(11.25)	--	--	A(9.3)	--	--	--	--	A2(12.5)
B(10.25)	B(10.25)	B(10.25)	B(7.1)	B(7.1)	B(7.1)	A(11.7)	--	--
C(9.85)	C(9.85)	C(9.85)	C(5.8)	C(5.8)	C(5.8)	B(11.5)	B(11.5)	--
--	D1(9.7)	D1(9.7)	D(5.1)	D(5.1)	D(5.1)	C(8.5)	C(8.5)	C(8.5)
D(5.8)	D(5.8)	C(5.8)	--	--	E1(4.8)	D(5.1)	D(5.1)	D(5.1)
--	E1(5.15)	--	--	--	E2(3.1)	--	--	E1(4.8)
E(2.0)	E(2.0)	E(2.0)	--	E3(3.0)	E3(3.0)	E(1.35)	E(1.35)	E(1.35)
			E(2.4)	E(2.4)	E(2.4)	F(0.95)	F(0.95)	F(0.95)
			F(2.0)	F(2.0)	F(2.0)			
			G(1.95)	G(1.95)	--			
			H(1.8)	H(1.8)	H(1.8)			
			I(1.4)	I(1.4)	I(1.4)			
			J(1.35)	J(1.35)	J(1.35)			
			K(0.95)	K(0.95)	K(0.95)			
39.15	42.75	49.05	39.15	42.8	48.75	39.1	41.9	47.7

Figura 5.- Diagrama esquemático de los patrones de restricción de la Figura 4. Los números en parentesis corresponden a los pesos moleculares en Md y los fragmentos alfanúmericos a los fragmentos nuevos producidos por la inserción de los transposones.

## RTF



## pRTF-2

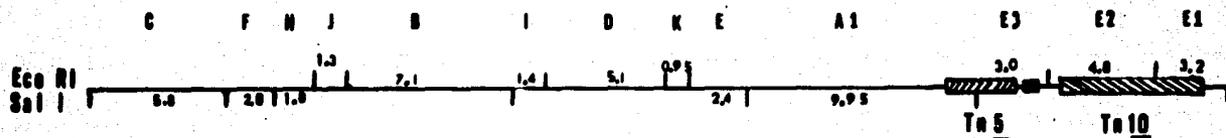


Figura 6.- Mapa de restricción de los plásmidos RTF (tomado de Clerget, M. et al) y pRTF-2 para las enzimas EcoRI y SalI. Las letras corresponden a los fragmentos generados por la doble digestión EcoRI/SalI y los números a los pesos moleculares en Md de los fragmentos.

tricción de la Figura 4.

El patrón de restricción de RTF es igual al reportado por Blohm, D. & Goebel, W. (56) y Gleget, et al (41). La inserción del Tn5 en el RTF provoca la desaparición del fragmento A de EcoRI/SalI y la aparición de los fragmentos A1 y E3 de EcoRI/SalI. La inserción del Tn10 en el plásmido pRTF-1 causa la desaparición del fragmento G de EcoRI/SalI produciendo dos nuevos fragmentos E1 y E2. La banda E3 generada por la inserción del Tn5, contiene la secuencia de inserción IS1 (ver Figura 19 carril 6). Estos datos indican que la secuencia IS1 está flanqueada por los transposones Tn5 y Tn10, que se encuentran muy cercanos. En la Figura 6 se esquematiza el mapa de restricción de los plásmidos RTF y pRTF-2.

#### B) Plásmido pR100-T.

El plásmido pR100-T es un plásmido derivado del R100 que perdió la resistencia a tetraciclina mediada por el Tn10. La pérdida de la resistencia a Tc se realizó en la cepa hiper-recombinante GM33. Se ha reportado que en esta cepa la excisión de los transposones Tn5 y Tn10 se encuentra incrementada (55,57).

Los plásmidos R100 y pR100-T, se purificaron por gradientes de CsCl-BrEt y se analizaron con las enzimas de restricción BglIII, SalI y EcoRI (Figura 8B). Los fragmentos del gel se transfirieron a filtros de nitrocelulosa por la técnica de Southern y se hibridizaron con el fragmento de HincII de 1275 pb del Tn10 obtenido del plásmido pRT29 (58) y con el fragmento de PvuII/EcoRII de 578 pb de la IS1 purificado del plásmido pBR322::IS1 (Figura 8A y 8C).

Tanaka, et al (43) y Barton, et al (42) reportaron el mapa de restricción del plásmido NR1 para las enzimas EcoRI y SalI (Figura 7). El plásmido NR1, es el mismo que el R100. Sin embargo, para fines prácticos de este trabajo, el plásmido reportado por estos dos grupos se denominará NR1 y el utilizado en

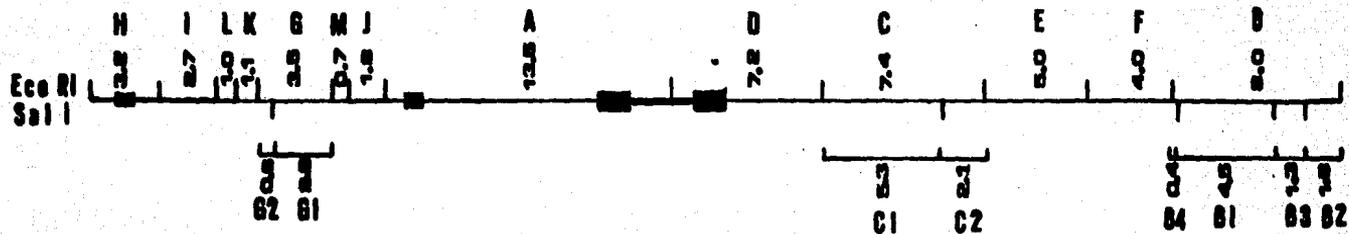


Figura 7.- Mapa de restricción del plásmido NR1 reportado por Tanaka, N. et al (43) y Barton, C.R., et al (42).

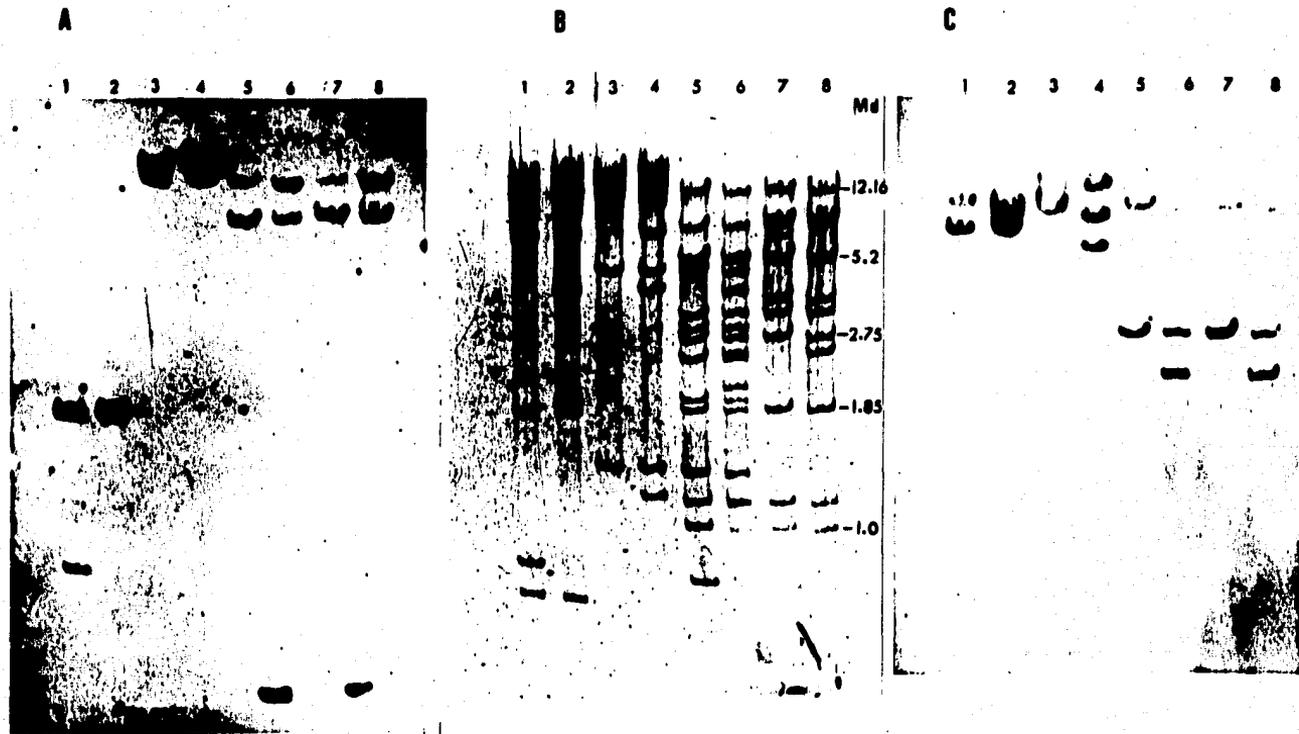


Figura 8.- Caracterización de los plásmidos pR100-T (carriles 1,3,5,7) y R100 (carriles 2,4,6,8). A) Autorradiografía de la transferencia tipo Southern del gel mostrado en B después de la hibridización con el fragmento de HincII de 1275 pb del Tn<sub>10</sub>. B) Patrón de restricción con las enzimas; BglIII (carriles 1,2); SalI (carriles 3,4); EcoRI (carriles 7,8); y la doble digestión EcoRI/SalI (carriles 5,6). C) Autorradiografía de la transferencia tipo Southern del gel mostrado en B después de la hibridización con el fragmento de PvuII/EcoRII de 578 pb de la IS<sub>1</sub>.

SAL I		SAL I/EcoRI		EcoRI	
R100	pR100-T	R100	pR100-T	R100	pR100-T
A(23.1)*●	A(23.1)*●	A(12.16)*●	A(12.16)*○	A(12.16)*●	A(12.16)*○
B(11.7)	B(11.7)	B(7.2)●	B(7.2)●	B(8.0)	B(8.0)
--	C1(10.7)*	C(5.25)	C(5.25)	C(7.4)	--
C(10.12)*	--	D(5.2)	D(5.2)	D(7.2)●	D(7.2)●
D(7.0)*	--	E(4.65)	E(4.65)	E(5.25)	E(5.25)
E(4.65)	E(4.65)	F(4.05)	--	F(5.2)	F(5.2)
F(4.05)	--	G(3.28)*	G(3.28)*	G(3.7)	G(3.7)
G(1.33)	G(1.33)	H(2.9)	H(2.9)	H(3.28)*	H(3.28)*
H(1.15)	--	I(2.75)	I(2.75)	I(2.75)	I(2.75)
		J(2.44)*	--	J(2.44)*	--
		K(2.39)	K(2.39)	K(1.85)	K(1.85)
		L(2.07)	--	L(1.1)	L(1.1)
		M(1.9)	M(1.9)	M(1.0)	M(1.0)
		N(1.85)	N(1.85)	N(0.75)	N(0.75)
		O(1.33)	O(1.33)	--	O(0.35)●
		P(1.15)	--		
		Q(1.1)	Q(1.1)		
		R(1.0)	R(1.0)		
		S(0.75)	S(0.75)		
		T(0.6)	T(0.6)		
		U(0.4)	U(0.4)		
		--	V(0.35)●		
63.1	51.48	64.42	55.06	62.08	52.59

Figura 9.- Diagrama esquemático de los patrones de restricción de la Figura 8. Los números en parentesis son los pesos moleculares en Md de los fragmentos. (\*) y (●) indican los fragmentos que hibridizaron con los monitores utilizados para la secuencia IS<sub>1</sub> y Tn<sub>10</sub>, respectivamente. (○) indica hibridización parcial con el monitor para el Tn<sub>10</sub>.

esté trabajo R100. Los fragmentos generados con las enzimas de restricción del plásmido R100 se clasificaron en orden alfabético de mayor a menor peso molecular.

El análisis comparativo de los patrones de restricción de los plásmidos R100 y NR1 (Figura 10), muestra que muchos fragmentos generados con las enzimas de restricción son similares, pero que se presentan algunas diferencias las cuales son: a) hay dos fragmentos de EcoRI extra en el R100 (Bandas F y J); b) la doble digestión EcoRI/SalI genera 5 fragmentos nuevos en el R100 que no están presentes en el NR1 (bandas D, F, J, K y P); c) los fragmentos de EcoRI/SalI F y C1 del NR1 no están presentes en el R100; d) el R100 contiene 3 secuencias de inserción IS1, mientras que el NR1 tiene 2, la secuencia se IS1 extra en el R100 se localiza en el fragmento J de EcoRI/SalI. En base al análisis comparativo podemos suponer que el plásmido NR1 y el R100 son iguales en la región r-det y parte del RTF (fragmentos de EcoRI B, H, I, L, K, G, M, J, A y D).

El patrón de restricción del pR100-T, muestra que no se deletó el Tn10 como se esperaba, ya que varias bandas hibridizan con un fragmento del gene tetA que es parte del Tn10 (Figura 8A; carriles 1,3,5,7).

Comparando los plásmidos R100 y pR100-T se observan las siguientes diferencias (Figura 9): a) los fragmentos de SalI C, D, F y H desaparecen en el plásmido pR100-T y aparece un nuevo fragmento de 10.7 Md (C1). La desaparición de los fragmentos C y D y la aparición del fragmento C1, que contienen a la secuencia de inserción IS1, sugiere que la pérdida de los fragmentos pudo ocurrir por recombinación entre las IS1, b) el fragmento J de EcoRI, que contiene una IS1, desaparece en el pR100-T, c) el fragmento A de EcoRI/SalI disminuyó la intensidad de hibridización con el monitor del Tn10 en el pR100-T, pero además apareció un fragmento de 0.35 Md que hibridiza con el gene tetA del Tn10, d) los fragmentos de EcoRI/SalI F, J, L y P desaparecen en el plásmido pR100-T.

En base a las diferencias anteriores, podemos decir

<u>EcoRI</u>		<u>EcoRI/SalI</u>	
NR1	R100	NR1	R100
A(13.5)*●	A(12.16)*●	A(13.5)*●	A(12.16)*●
B(8.0)	B(8.0)	--	--
C(7.4)	C(7.4)	--	--
D(7.2)●	D(7.2)●	D(7.2)●	B(7.2)●
E(5.0)	E(5.25)	E(5.0)	C(5.25)
--	F(5.2)	--	D(5.2)
--	--	C1(5.3)	--
--	--	B1(4.58)	E(4.65)
F(4.0)	--	F(4.0)	--
--	--	--	F(4.05)
G(3.5)	G(3.7)	--	--
H(3.2)*	H(3.28)*	H(3.2)*	G(3.28)*
--	--	G1(2.85)	H(2.9)
I(2.75)	I(2.75)	I(2.75)	I(2.75)
--	J(2.44)*	--	J(2.44)*
--	--	--	K(2.39)
--	--	C2(2.1)	L(2.07)
--	--	B2(1.85)	M(1.9)
J(1.79)	K(1.85)	J(1.79)	N(1.85)
--	--	B3(1.33)	O(1.33)
--	--	--	P(1.15)
K(1.1)	L(1.1)	K(1.1)	Q(1.1)
L(1.0)	M(1.0)	L(1.0)	R(1.0)
M(0.75)	N(0.75)	M(0.75)	S(0.75)
--	--	G2(0.59)	T(0.6)
--	--	B4(0.4)	U(0.4)
59.19	62.08	59.29	64.42

Figura 10.- Diagrama comparativo de los patrones de restricción para la enzima EcoRI y la doble digestión EcoRI/SalI de los -- plásmidos NR1 (basado en, Barton, C.R., et al) y R100. (\*) y (●) indican los fragmentos que tienen a la secuencia IS<sub>1</sub> y al Tn<sub>10</sub>, respectivamente.

que el plásmido pR100-T, presenta una delección de aproximadamente 9.5 Md, en donde hay la pérdida de una secuencia de inserción IS1 y un rearrreglo en el Tn10, que produce la aparición del fragmento de EcoRI de 0.35 Md y una menor intensidad de hibridización en el fragmento A de EcoRI. Los fragmentos F, J y P que se deletaron en el R100, no se encuentran en el plásmido NR1. Por estos datos podemos suponer que toda la región del r-det y parte del RTF se mantiene inalterable.

## 2.- Incompatibilidad y frecuencia de rearrreglos genéticos entre los plásmidos pRTF-2 y pR100-T en diferentes mutantes en re combinación.

Para este estudio se eligieron 4 cepas de E. coli: una cepa silvestre (AB1157), y tres cepas mutantes en recombinación; una cepa RecA<sup>-</sup> (JC2924), una cepa RecF<sup>+</sup> (JC7623) y una cepa RecE<sup>+</sup> en condiciones recA<sup>-</sup> (JC9604). El fenotipo de las cuatro cepas se comprobó por su sensibilidad a la luz ultravioleta y a nitrofurantoina.

En la Figura 11 se muestra el porcentaje de sobrevivencia de las cepas AB1157, JC2924, JC7623 y JC9604, a diferentes tiempos de irradiación de luz ultravioleta. La cepa AB1157 (silvestre) presentó una mayor resistencia a la luz ultravioleta que las otras cepas; la cepa JC7623 presentó mayor resistencia que las cepas JC2924 y JC9604; y la que presentó la mayor sensibilidad a la luz ultravioleta fué la cepa JC9604. El nivel de resistencia a nitrofurantoina para las cepas AB1157, JC2924, JC7623 y JC9604 fué de 5.0, 0.2, 5.0, y 0.1 µg/ml, respectivamente.

A) Selección e identificación de células con plásmidos con rearrreglos genéticos. Cinética de pérdida de los marcadores genéticos.

La estrategia experimental para la selección de cé-

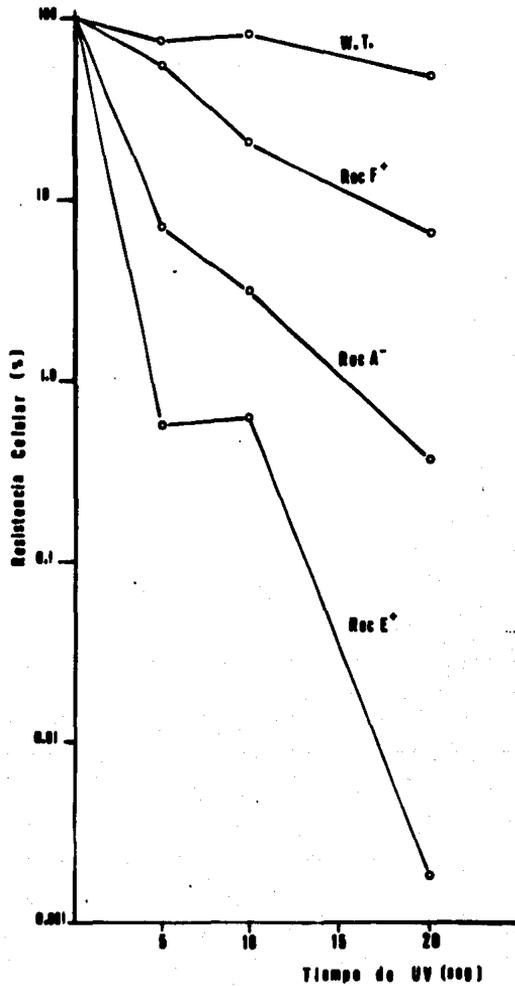


Figura 11.- Grafica de sensibilidad celular a la luz ultra violeta de las cepas AB1157 (silvestre), JC2924 (recA<sup>-</sup>), JC7623 (recA<sup>-</sup> recB<sup>-</sup> recC<sup>-</sup> sbcB<sup>-</sup>), y JC9604 (recB<sup>-</sup> recC<sup>-</sup> sbcA<sup>-</sup>).

lulas con plásmidos con rearrreglos genéticos, se basó en la incompatibilidad de los plásmidos pRTF-2 y pR100-T. Esta estrategia consistió en introducir primero los dos plásmidos por conjugación múltiple (Materiales y Métodos) en las cepas AB1157 (silvestre), JC2924 (RecA<sup>-</sup>), JC7623 (RecF<sup>+</sup>) y JC9604 (RecE<sup>+</sup> en condiciones recA<sup>-</sup>). La selección de cepas receptoras con los dos plásmidos se realizó en medio MDR (Mc Conkey con Sm, Tc, Km y Cm). Los experimentos se iniciaron con 5 colonias de las exconjugantes (para obtener resultados más estadísticos) que se resuspendieron en medio L-MDR y se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar un total de 28 a 35 doblajes celulares (incluyendo los doblajes en medio MDR sólido de selección de las exconjugantes). En este medio solo crecen las células -- que contienen la información genética de resistencia a Tc, Km y Cm codificada por los dos plásmidos (pRTF-2 y pR100-T). Posteriormente las bacterias se cultivaron en Luria líquido sin antibióticos por 70 a 85 doblajes celulares. Durante el crecimiento en medio Luria líquido, debido al fenómeno de incompatibilidad y a la inexistencia de presión selectiva para la información genética de resistencia a antibióticos codificada por los plásmidos, la población bacteriana que contiene dos plásmidos disminuye y la que contiene un sólo plásmido se incrementa.

Durante todo el experimento los cultivos se mantuvieron en fase exponencial mediante diluciones periódicas seriadas en medio Luria fresco. Al inicio del experimento se realizaron diluciones bajas para conservar los rearrreglos genéticos de baja frecuencia, parcialmente amplificados por el cultivo inicial en medio MDR; mientras que al final se realizaron diluciones altas que permiten tener un mayor número de doblajes celulares, los cuales ayudan a la eliminación de la población decreciente con dos plásmidos. Después de cada dilución los cultivos se sembraron en medio Luria y en medio Luria con uno ó más antibióticos: Cm; CmTc; CmKm; y MDR. En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos de estos experimentos.

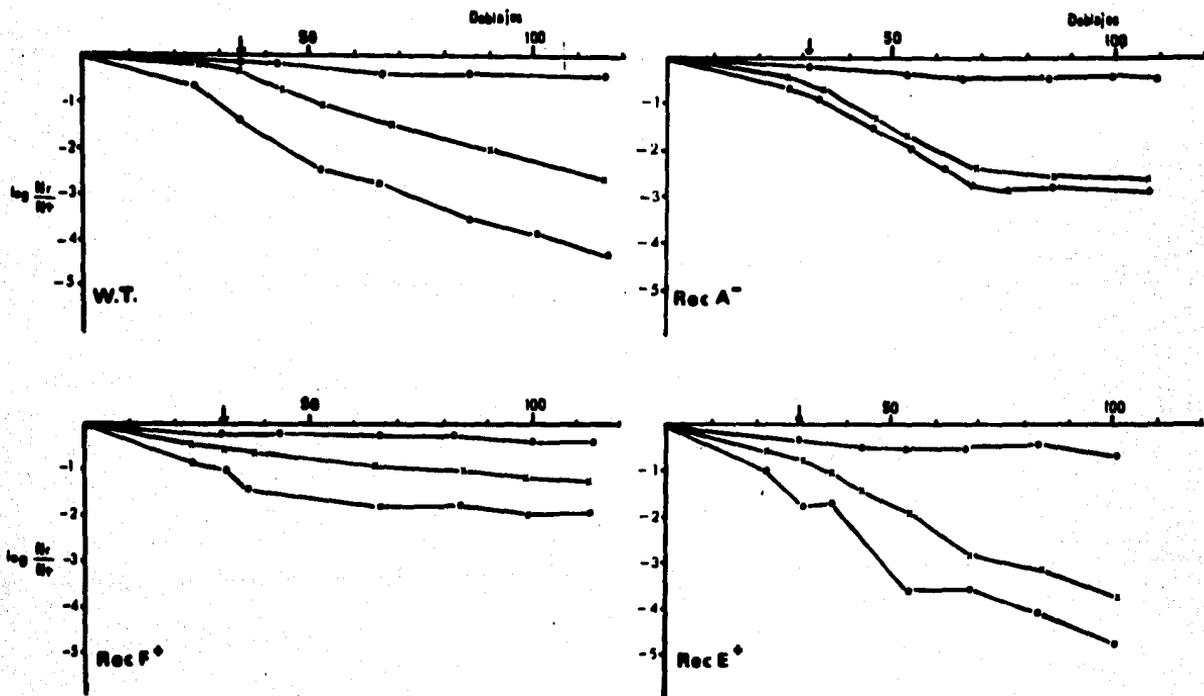


Figura 12.- Cinética de persistencia de los marcadores genéticos de los plásmidos pRTF-2 ( $Tc^R Km^R$ ) y pR100-T ( $Cm^R$ ). Los valores se expresan como el logaritmo de la población resistente entre la población total contra el número de doblajes celulares: ●,  $Cm^R$  &  $Tc^R Km^R$ ; X,  $Cm^R Tc^R$  &  $Cm^R Km^R$ ; O,  $Cm^R Tc^R Km^R$ . La flecha indica el cambio de crecimiento de medio MDR a medio Luria.

La cepa JC2924 ( $\text{recA}^-$ ), después de 30 doblajes celulares con presión selectiva y 79 sin presión selectiva, generó una población donde aproximadamente el 50% de la población presentó el fenotipo correspondiente al pRTF-2 ( $\text{Tc}^r \text{Km}^r$ ) y el otro 50% el del pR100-T ( $\text{Cm}^r$ ); mientras que la proporción de células con el fenotipo del pR100-T más uno de los dos transposones ( $\text{Cm}^r \text{Km}^r$  ó  $\text{Cm}^r \text{Tc}^r$ ) fué similar al de las células con el fenotipo de ambos plásmidos (Figura 12). Esto sugiere que los transposones Tn5 y Tn10 se encuentran en la misma molécula (pRTF-2) y que la frecuencia de transposición, que es un evento  $\text{recA}^-$  independiente, en esta cepa no es detectable con nuestro sistema experimental. Si el Tn5 ó el Tn10 transpusieran al plásmido pR100-T o al cromosoma con una alta frecuencia y de manera independiente, el número de células capaces de crecer en los medios con CmKm ó CmTc, sería mayor al número de células en el medio MDR. El transposón con la frecuencia más alta, determinaría una diferencia mayor entre estos números.

Las cepas AB1157 (silvestre), JC7623 ( $\text{recB}^- \text{recC}^- \text{sbcB}^-$ ) y JC9604 ( $\text{recA}^- \text{recB}^- \text{recC}^- \text{sbcA}^-$ ), se comportaron de manera similar en cuanto a la pérdida de los marcadores genéticos plasmídicos. En estas tres cepas el fenómeno de incompatibilidad es similar al presentado por la cepa JC2924.

Para el caso de estos dos plásmidos, podemos observar que no existe ventaja selectiva durante la expresión de incompatibilidad de un plásmido sobre el otro y que el genotipo de las cepas utilizadas no influye de manera importante sobre este fenómeno. Sin embargo, y a diferencia de lo encontrado en la cepa JC2924, en las tres cepas, AB1157, JC7623 y JC9604, - el número de células en los medios CmKm y CmTc fué mayor que el del medio MDR (Figura 12). Esta diferencia podría deberse principalmente a eventos de recombinación, ya que en las condiciones experimentales utilizadas, la transposición del Tn5 y Tn10, que es normal en las cepas  $\text{recA}^-$  (32), no se detecta. Estos eventos de recombinación, plásmido-plásmido o plásmido-

chromosoma pueden inducir a que el Tn<sub>5</sub> y Tn<sub>10</sub> no se encuentren en la misma unidad genética.

La frecuencia de pérdida de los marcadores genéticos de ambos plásmidos en las cuatro cepas es diferente (Figura 13). La cepa JC7623 presenta la cinética más lenta de pérdida y la cepa JC9604 la cinética más rápida. La cinética de pérdida de estos marcadores en las cepas AB1157 y JC2924 presentó valores intermedios. Al final del experimento la proporción de células para cada cepa, capaces de crecer en el medio MDR fue: AB1157,  $1 \times 10^{-4}$ ; JC2924,  $0.5 \times 10^{-4}$ ; JC7623,  $1 \times 10^{-2}$ ; y JC9604,  $7 \times 10^{-4}$ . Estas cinéticas diferentes pueden deberse a que incompatibilidad o la frecuencia de rearrreglos por recombinación son diferentes en las cuatro cepas.

En el medio MDR pueden crecer únicamente las células con el fenotipo Cm<sup>r</sup> Km<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup> codificados por los plásmidos, este fenotipo puede presentarse en células que tienen los dos plásmidos iniciales (pRTF-2 y pR100-T) ó en células que contengan un solo plásmido, en este caso la información genética relacionada con la resistencia a los antibióticos seleccionados esta presente, pero no se localiza en los dos plásmidos iniciales, sino que pueden estar en el plásmido o en el cromosoma; es decir, sufrió un rearrreglo genético. Para diferenciar estos dos tipos de células capaces de crecer en medio MDR, al final del experimento (de 100 a 115 doblajes celulares) se tomaron 10 colonias de los medios MDR. A las colonias se les extrajo el DNA plasmídico por medio de lisados claros alcalinos y DNA se visualizó por electroforesis en geles de agarosa (Figura 14)

Los resultados típicos de un experimento obtenidos para cada cepa fueron los siguientes:

- a) AB1157. Una colonia presentó dos plásmidos de tamaño similar a los iniciales ( pRTF-2, 48.75 Md y pR100-T, 55.06 Md) (ejemplo, Figura 14 carril 1). Nueve colonias presentaron 3 bandas de DNA extracromosomal, una de ellas

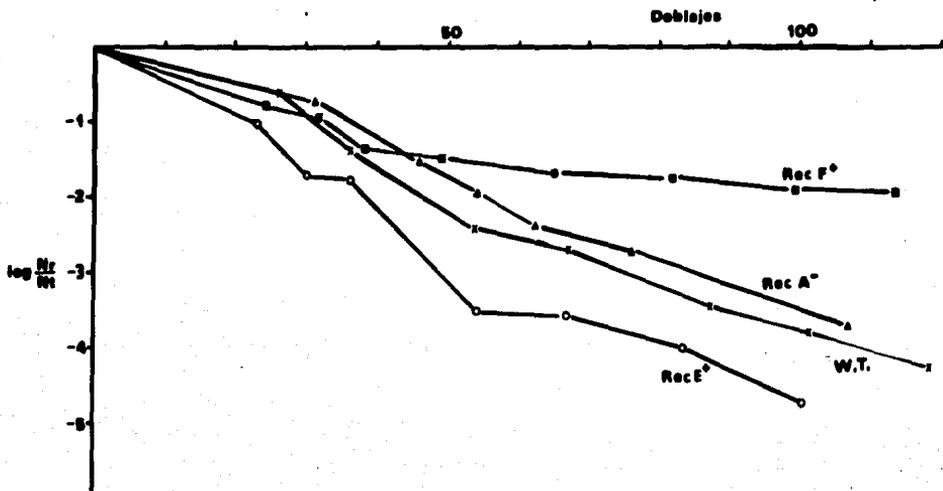


Figura 13.- Cinética de persistencia de los marcadores genéticos de ambos plásmidos (pRTF-2 y pR100-T) en las diferentes cepas de *E. coli*; AB1157 (silvestre), JC2924 (RecA<sup>-</sup>), JC7623 (RecF<sup>+</sup>) y JC9604 (RecE<sup>+</sup>).

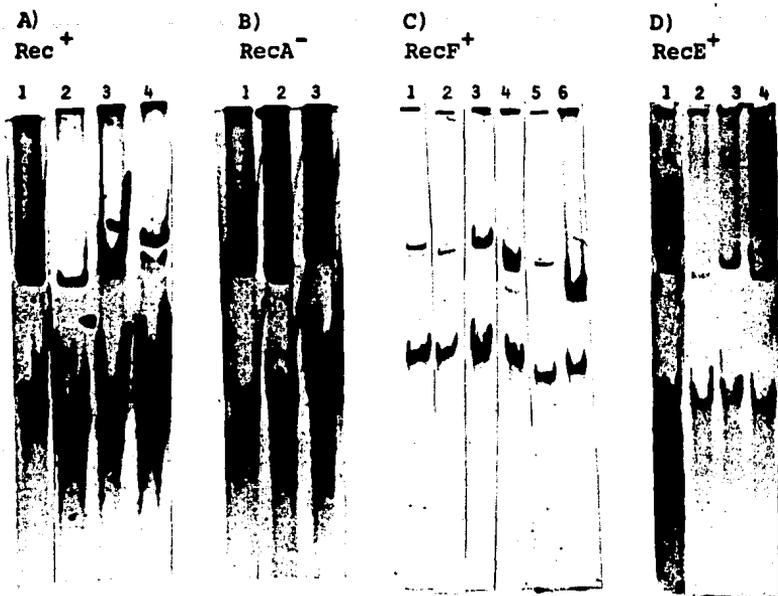


Figura 14.- Visualización de DNA plasmídico de algunas colonias con el fenotipo de ambos plásmidos después del experimento de selección de rearrreglos genéticos.  $Rec^+$  (AB1157),  $RecA^-$  (JC2924),  $RecF^+$  (JC7623),  $RecE^+$  (JC9604); 2, pRTF-2; 3, pR100-T.



Figura 15.- Visualización de DNA plasmídico de algunas colonias de la cepa JC2924 ( $recA^-$ ) después del experimento de selección de rearrreglos genéticos con mayor número de doblajes celulares con presión selectiva para ambos plásmidos; 2, pRTF-2; 3, pR100-T.

más intensa y con un peso molecular mayor al pR100-T y - dos más tenues con una movilidad electroforética similar a la de los plásmidos iniciales (ejemplo, Figura 14A carril 4).

- b) JC2924. Las 10 colonias analizadas contenían dos plásmidos similares a los iniciales (ejemplo, Figura 14B carril 1).
- c) JC7623. Dos colonias con dos plásmidos similares a los - iniciales (ejemplo, Figura 14C carril 1). Dos colonias con tres bandas similares a las presentadas por las colonias de la AB1157 (ejemplo, Figura 14C carril 4). Seis colonias con un solo plásmido. En este caso, los plásmidos fueron de dos tamaños, similar al pR100-T (ejemplo, Figura 14C carril 5) o menor al pRTF-2 (ejemplo, Figura 14C carril 6).
- d) JC9604. Seis colonias con dos plásmidos similares a los iniciales (ejemplo, Figura 14D carril 1) y cuatro colonias con un plásmido de tamaño similar al pRTF-2 (ejemplo 14D, carril 4)

El no encontrar rearrreglos genéticos en la cepa -- JC2924 puede deberse a la baja frecuencia de recombinación de los plásmidos en esta cepa. Por ello, se decidió realizar un experimento en donde se amplificó la posibilidad de aislar -- bacterias con rearrreglos genéticos , incrementando el tiempo de cultivo en medio MDR (41 doblajes celulares en lugar de 30). Bajo estas condiciones, se aislaron ocho colonias con un plásmido de peso molecular aproximado al pRTF-2 ( ejemplo, Figura 15 carril 4) y dos colonias con dos plásmidos de tamaño similar a los iniciales (ejemplo, Figura 15 carril 1).

- B) Cuantificación del fenómeno de incompatibilidad y de los rearrreglos genéticos en diferentes mutantes en recombinación.

Con los resultados anteriores, se puede calcular el número relativo de células con un plásmido con algún rearrreglo genético y el número relativo de células que contienen a los dos plásmidos iniciales. Conociendo la proporción de estas - dos poblaciones, el número de doblajes totales y el factor de dilución del cultivo en el experimento, se puede calcular los parámetros siguientes: a) Factor de compatibilidad ( $\beta$ ) o -- sea la fracción celular que contiene a los dos plásmidos por doblaje celular y b) la frecuencia mínima de rearrreglos genéticos por célula por doblaje celular ( $\alpha$ ). Estos dos parámetros se cuantificaron utilizando las ecuaciones descritas en el anexo.

Para obtener el factor de compatibilidad de los plásmidos en las cepas en los experimentos de selección, se utilizaron los valores de crecimiento sin presión selectiva. Para la población inicial se tomó el número de células con el fenotipo de ambos plásmidos presentes al final del cultivo en medio MDR y la población final se obtuvo por determinación fenotípica y visualización electroforética del DNA extracromosomal de las colonias. Por ejemplo, para un experimento de la cepa AB1157, la población con el fenotipo para ambos plásmidos fue de  $3.2 \times 10^7$  células/ml a los 31.2 doblajes celulares en medio MDR; este valor se tomó como el de la población inicial con - dos plásmidos. La población final con dos plásmidos a las -- 107.6 doblajes celulares fue de  $6.27 \times 10^3$  células/ml. Este valor se obtuvo calculando el número de células en MDR que al final del experimento aún contenían el fenotipo de ambos plásmidos. El número de células en MDR fue de  $6.27 \times 10^4$  por ml; sin embargo, sólo una de cada 10 colonias analizadas contenía a los dos plásmidos. El número de doblajes celulares en medio sin presión selectiva fue de 76.4 y el factor de dilución fue

de  $9.6 \times 10^{-24}$ . Estos valores se sustituyeron en la ecuación 1 y se obtuvo un valor de compatibilidad de 0.89 fracción celular con dos plásmidos por doblaje celular, o sea que por cada doblaje celular el 89% de las células sigue manteniendo ambos plásmidos y el 11% sólo tiene un plásmido. Los valores de compatibilidad promedio de varios experimentos de los plásmidos pRTF-2 y pR100-T en las cepas AB1157, JC2924, JC7623 y JC9604, se encuentran en la Tabla 3. Estos valores son muy similares al reportado por Uhlin, B.E. & Norsdtröm, K. (59) para los plásmidos R100 y R1-19, que es de 0.84.

La frecuencia de rearrreglos genéticos se cuantificó con la ecuación 2 descrita en el anexo. Dado que el experimento se inicio con 5 colonias exconjugantes y que se tomaron en cuenta los doblajes celulares de las células en medio MDR sólido, la población inicial de células con dos plásmidos fué de 5 para todas las cepas y experimentos. El número de células con rearrreglos genéticos se calculó restando al número total final de células que crecen en medio MDR el número de células que aún contenían dos plásmidos. Los doblajes celulares cuando las células crecieron en MDR, se corrigieron utilizando el factor de compatibilidad y la ecuación 1, esto se debe a que en este medio las células que no tienen el fenotipo de ambos plásmidos no crecen. Por ejemplo, para un experimento de la cepa AB1157, la población inicial fué de 5 células, la población final fué de  $5.64 \times 10^4$  células con rearrreglo genético por ml (la población con el fenotipo de los dos plásmidos fue de  $6.27 \times 10^4$  células/ml, de las cuales 9 de cada 10 tenían un rearrreglo genético), el factor de compatibilidad de 0.89, los doblajes celulares totales corregidos de 108.34 (los doblajes sin corregir fueron de 107.6), y el factor de dilución fué de  $4.8 \times 10^{-25}$ . Estos valores sustituidos en la ecuación 2 nos da una frecuencia de  $6.54 \times 10^{-6}$  rearrreglos genéticos por célula por doblaje celular.

En la Tabla 3 se muestran los valores para la frecuencia de rearrreglos genéticos. La frecuencia en la cepa JC7623

Tabla 3.- Valores de compatibilidad y frecuencia de rearreglos genéticos.

VIA RECOMB.	$\beta^a$	$a^b$
Silvestre <sup>c</sup>	0.89	$2.4 \times 10^{-6}$
RecA <sup>-</sup>	0.89	$2.7 \times 10^{-11}$
RecF <sup>+</sup> ( <u>recA</u> <sup>+</sup> ) <sup>d</sup>	0.93	$1.2 \times 10^{-4}$
RecE <sup>+</sup> ( <u>recA</u> <sup>-</sup> ) <sup>d</sup>	0.84	$4.8 \times 10^{-9}$

a  $\beta$  = fracción celular con dos plásmidos por doblaje celular

b  $a$  = frecuencia de rearreglos genéticos por célula por doblaje celular

c valores promedio de 3 experimentos

d valores promedio de 2 experimentos

( $1.2 \times 10^{-4}$ ) es mucho más alta que para la cepa silvestre ( $2.4 \times 10^{-6}$ ), mientras que la cepa JC2924 tiene la frecuencia más baja ( $2.7 \times 10^{-11}$ ) y para la cepa JC9604 la frecuencia fué de  $4.8 \times 10^{-9}$  rearrreglos genéticos por célula por doblaje celular.

### 3.- Análisis molecular de los rearrreglos genéticos.

#### A) Identificación de los rearrreglos genéticos.

Las células con rearrreglos genéticos seleccionados en los experimentos pueden deberse a: a) integración del pRTF-2 ó del pR100-T en el cromosoma, b) transposición del Tn<sub>5</sub> y Tn<sub>10</sub> al cromosoma, c) transposición del Tn<sub>5</sub> y Tn<sub>10</sub> al pR100-T y d) formación de cointegrados entre los plásmidos pRTF-2 y pR100-T. Para poder diferenciar entre los eventos plásmido-plásmido y plásmido-cromosoma se realizaron conjugaciones de las cepas - con rearrreglos genéticos con la cepa MX881 Nal<sup>r</sup> (recA<sup>-</sup>).

Las conjugaciones se realizaron a tiempos cortos - (30 min) y se seleccionaron en medio Luria con un antibiótico (Tc ó Km ó Cm). Posteriormente se determinó el fenotipo de - las exconjugantes para la resistencia a otros antibióticos y a algunas de éstas se les extrajo el DNA plasmídico con lisados claros alcalinos y el DNA se separó y visualizó por electroforesis en geles de agarosa.

Las colonias de las cepas mutantes JC2924 y JC9604 que tenían un rearrreglo genético cuyo fenotipo era el de ambos plásmidos, pero sólo tenían un plásmido del tamaño del pRTF-2, sólo lograron transferir por conjugación el fenotipo del plásmido pRTF-2 (Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>). Este dato sugiere que en estas mutantes el evento fué la integración del plásmido pR100-T al cromosoma.

Las colonias de la cepa JC7623 con el fenotipo de ambos plásmidos que contenían un rearrreglo genético mostraron - una heterogeneidad en el tamaño del plásmido y en el fenotipo conjugable: a) las colonias que contenían un plásmido del ta

maño del pR100-T con el fenotipo de ambos plásmidos, sólo lograron transferir el fenotipo perteneciente al pR100-T, b) las colonias con un plásmido del tamaño del pR100-T con el fenotipo de ambos plásmidos, lograron transferir los marcadores de ambos plásmidos, c) colonias con el fenotipo de ambos -- plásmidos pero con un plásmido de menor tamaño al pRTF-2, no lograron transferir por conjugación algún marcador genético plasmídico y d) las colonias con el fenotipo de ambos plásmidos, pero con 3 bandas extracromosomales (similar a la cepa silvestre) se encontraron dos tipos de colonias; d.1) las que por conjugación transferían de manera independiente un plásmido del tamaño del pR100-T con el fenotipo de este y un plásmido del tamaño del pRTF-2, pero sólo codificaba la resistencia a Km, y d.2) las que transferían por conjugación de forma independiente un plásmido del tamaño del pR100-T, con el fenotipo del pR100-T más la resistencia a Km (Tn<sub>5</sub>) y un plásmido - Km<sup>r</sup> de tamaño similar al pRTF-2.

En las colonias de la cepa AB1157 con el fenotipo de ambos plásmidos que contenían 3 bandas de DNA extracromosomal, todas se comportaron de manera similar y se lograron obtener 3 tipos de exconjugantes; a) las que tenían un plásmido de - peso molecular mayor a 56 Md con el fenotipo de ambos plásmidos, b) las que tenían un plásmido de tamaño similar al -- pR100-T (55.5 Md) y el fenotipo es idéntico al pR100-T, c) las que tenían un plásmido de tamaño similar al pRTF-2 (49 Md) y su fenotipo idéntico al pRTF-2. La intensidad de las bandas en los geles de electroforesis de las cepas AB1157, así como su fenotipo conjugable de cada plásmido y que en la exconjugante recA<sup>-</sup> solo se observa un plásmido (Figura 16 y 17), nos sugiere que el plásmido grande es un cointegrado formado por los plásmidos pRTF-2 y pR100-T y que los plásmidos de menor peso molecular y de menor intensidad, cuyo peso molecular es similar a los plásmidos iniciales, son generados por recombinación intramolecular del plásmido de más alto peso molecular.

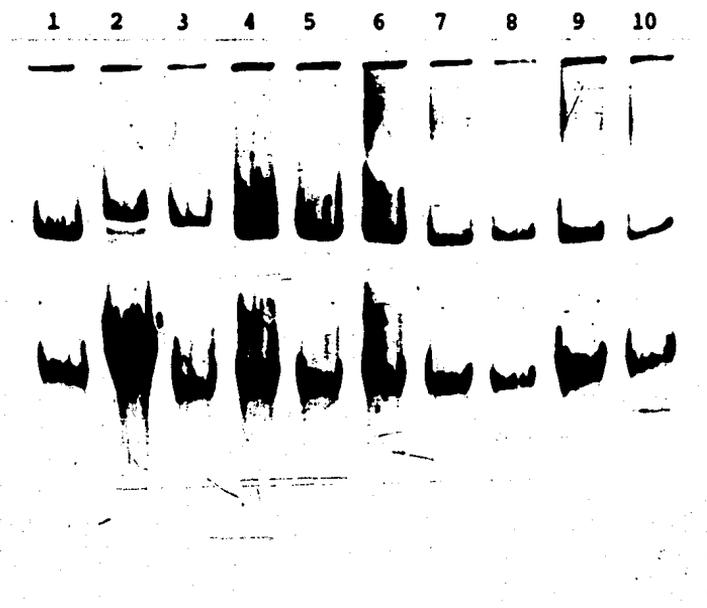
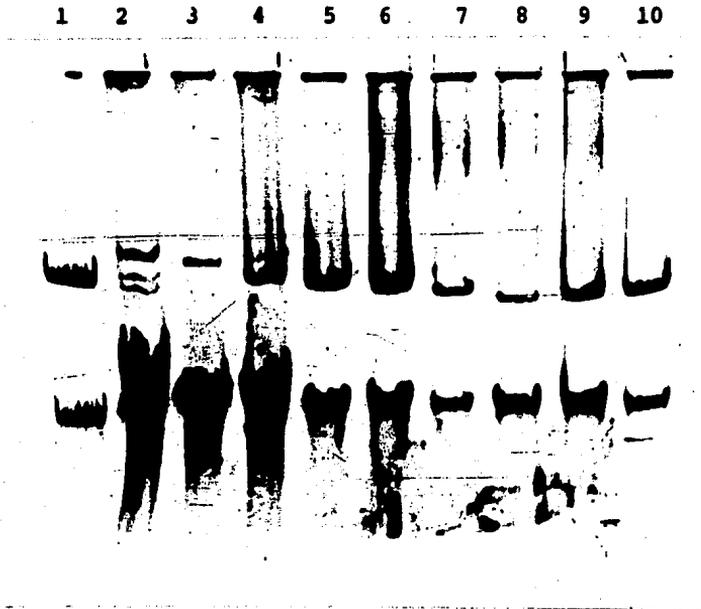


Figura 16.- Electroforesis de DNA plasmídico de algunas exconjugantes de una colonia de la cepa AB1157 con rearreglos genéticos. 1 y 5, pR100-T; 2, AB1157 (con rearreglo genético); 3, MX881/pRA111 ( $Cm^R Tc^R Km^R$ ); 4, MX881/pRA111 + pR100-T; 6, MX881/pRA115 ( $Cm^R$ ) + pR100-T; 7, MX881/pRA115; 8, MX881/pRA116 ( $Tc^R Km^R$ ); 9, MX881/pRA116 + pRTF-2; 10, pRTF-2.



**Figura 17.- Electroforesis de DNA plasmídico de algunas exconjugantes de una colonia de la cepa AB1157 con rearreglo genético. 1 y 5, pR100-T; 2, AB1157 (con rearreglo genético); 3, MX881/pRA131 ( $Cm^R Tc^R Km^R$ ); 4, MX881/pRA131 + pR100-T; 6, MX881/pRA135 ( $Cm^R$ ) + pR100-T; 7, MX881/pRA135; 8, pRTF-2; 9, MX881/pRA136 ( $Tc^R Km^R$ ) +pRA136; 10, MX881/pRA136.**

B) Análisis molecular de los plásmidos pRA111, pRA131, pRA115, pRA135, pRA116 y pRA136.

Para el análisis molecular se eligieron únicamente los plásmidos con rearrreglos genéticos más frecuentes. En tres experimentos diferentes, la cepa AB1157 (silvestre) generó con una frecuencia relativamente alta ( $2.4 \times 10^{-6}$ ), células que presentaron el patrón de 3 bandas de DNA extracromosomal (ver resultados 2A). El análisis molecular se realizó en los plásmidos presentes en dos colonias que presentaron el patrón de 3 plásmidos, aisladas de experimentos diferentes. Los plásmidos se separaron, utilizando para ello, sus propiedades conjugativas y se eligió a la cepa MX881  $\text{Nal}^{\text{r}}(\text{recA}^{-})$  como receptora. De esta manera se obtuvieron de una colonia, células con el plásmido pRA111 (Mer Cm Sm-Sp Su Km Tc), con el pRA115 (Mer Cm Sm-Sp Su) y con el pRA116 (Km Tc) y de la otra colonia, células con el pRA131 (Mer, Cm Sm-Sp Su Km Tc), con el pRA135 (Mer Cm Sm-Sp Su) y con el pRA136 (Km Tc) (ver Figuras 16 y 17).

Los plásmidos pRA111 y pRA131 en la cepa MX881  $\text{Nal}^{\text{r}}$ , presentaron una banda única de DNA extracromosomal de aproximadamente 100 y 80 Md, respectivamente; sin embargo, si se reintroducen a la cepa AB1157 ( $\text{recA}^{+}$ ) por conjugación, se genera nuevamente el patrón de 3 bandas de DNA extracromosomales. Un experimento de estabilidad de los marcadores de resistencia del pRA111 en la cepa AB1157 mostró que después de 70 doblajes celulares en medio Luria líquido, el 31% de las células tenían un fenotipo  $\text{Mer}^{\text{r}} \text{Cm}^{\text{r}} \text{Sm}^{\text{r}}\text{-Sp}^{\text{r}} \text{Km}^{\text{r}} \text{Tc}^{\text{r}}$ , el 40%  $\text{Km}^{\text{r}} \text{Tc}^{\text{r}}$ , el 22%  $\text{Mer}^{\text{r}} \text{Cm}^{\text{r}} \text{Sm}^{\text{r}}\text{-Sp}^{\text{r}}$ , el 6%  $\text{Km}^{\text{r}}$  y el 1%  $\text{Mer}^{\text{r}} \text{Cm}^{\text{r}} \text{Sm}^{\text{r}}\text{-Sp}^{\text{r}} \text{Tc}^{\text{r}}$ . Estos datos, más los resultados de las conjugaciones que permitieron separar los tres plásmidos, sugiere que el plásmido mayor genera por recombinación plásmidos que confieren resistencia a Km Tc y Mer Cm Sm-Sp y en menor frecuencia a Km y a Mer Cm Sm-Sp Tc.

Los plásmidos se purificaron por gradientes de CsCl-BrEt y se analizaron con las enzimas de restricción EcoRI y SalI. Los fragmentos de DNA se transfirieron a filtros de nítrocelulosa por la técnica de Southern y se hibridizaron con los monitores para el Tn10 e IS1 (Figuras 18,19,20y 21).

El estudio comparativo de los patrones de restricción y de las hibridizaciones tipo Southern con las sondas para el Tn10 e IS1 del plásmido pRA111 (91.5 Md) y de los plásmidos --originales pRTF-2 y pR100-T, mostró que: a) muchos de los --- fragmentos generados con EcoRI y EcoRI/SalI del pRA111, son similares en peso molecular a fragmentos generados con las mismas enzimas en los plásmidos pRTF-2 y pR100-T (Figuras 22 y 23), b) los fragmentos de EcoRI/SalI E1, E2 y E3 del pRTF-2 y los fragmentos A, C, D, E, G, M y O del pR100-T, no se encuentran en el pRA111 (Figura 23), c) los fragmentos de EcoRI/SalI A, G, H, I, J y K del pRA111 son fragmentos nuevos que no se encuentran en el pRTF-2 ó pR100-T (Figura 23), d) hay tres secuencias de inserción IS1 en el pRA111, localizadas en los fragmentos A, I y K de EcoRI/SalI (Figura 21 carril 5 y Figura 23), - e) los fragmentos de EcoRI/SalI del pRA111 A, C, H y Z hibridizaron fuertemente con el monitor del Tn10, mientras que los fragmentos G y K hibridizaron débilmente (Figura 21 carril 5 y Figura 23), f) El fragmento de EcoRI/SalI K (3.0 Md) del pRA111 no es el mismo al fragmento E3 del pRTF-2, ya que el primero hibridiza débilmente con el monitor del Tn10, mientras que el segundo no hibridiza (Figura 21 carriles 3 y 5 y Figura 23), g) El fragmento A de EcoRI del pRA111 no es idéntico al al fragmento A del pR100-T, en base a que el primero hibridizó fuertemente con el monitor del Tn10, mientras que el segundo hibridizó débilmente (Figura 20 carriles 3 y 5 y Figura 22).

El plásmido pRA111 por lo que podemos deducir es un cointegrado de los plásmidos pRTF-2 y pR100-T, pero no es un producto de una recombinación sencilla entre estos plásmidos, sino que parece ser un producto de varios eventos moleculares,

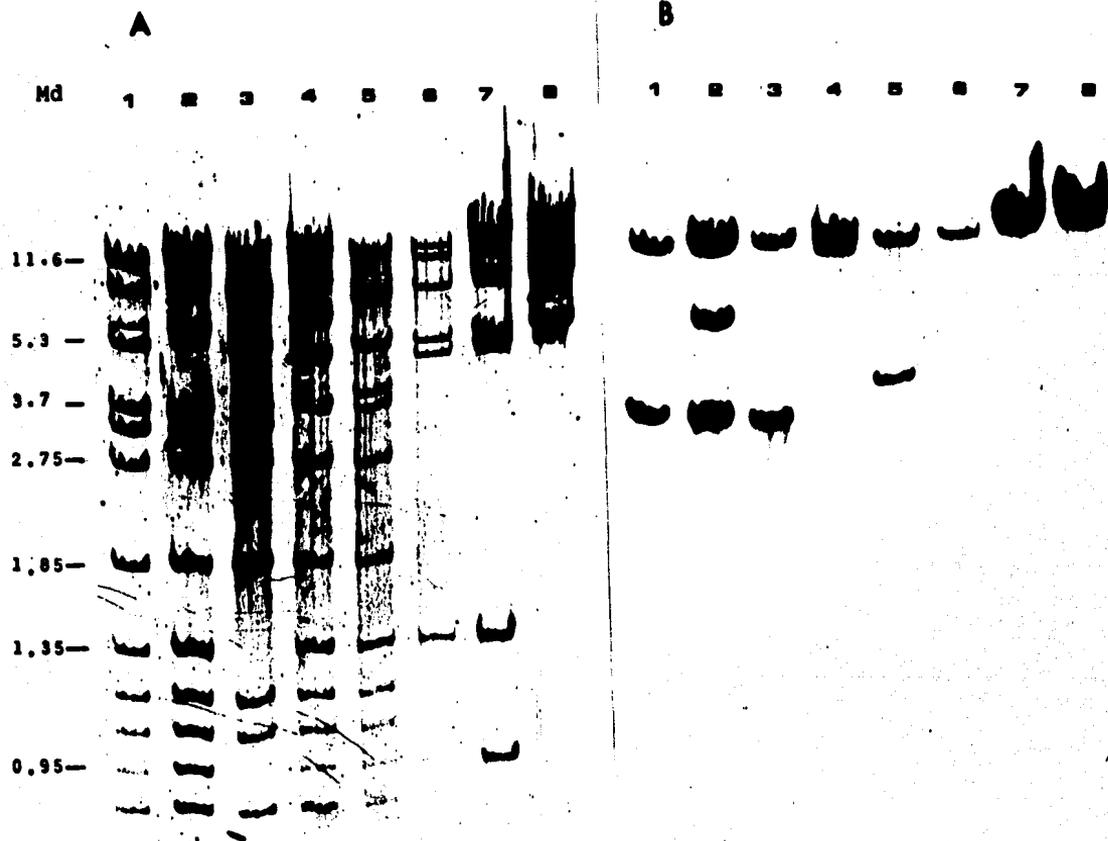


Figura 18.- Caracterización molecular de los plásmidos pRA135 (1), pRA115 (2), pR100-T (3), pRA131 (4), pRA111 (5), pRIF-2 (6), pRA136 (7) y pRA116 (8). A) Patrón de restricción con la enzima EcoRI, B) Autorradiografía de la transferencia tipo Southern del gel mostrado en A después de la hibridización con el fragmento de PvuII/EcoRII de 578 pb de la IS1.



Figura 19.- Caracterización molecular de los plásmidos pRA116 (1), pRA115 (2), pR100-T (3), pRA131 (4), pRA111 (5), pRTF-2 (6), pRA136 (7) y pRA135 (8). A) Patrón de restricción de la doble digestión EcoRI/SalI, B) Autorradiografía de la transferencia tipo Southern del gel mostrado en A después de la hibridación con el monitor para la secuencia IS1.

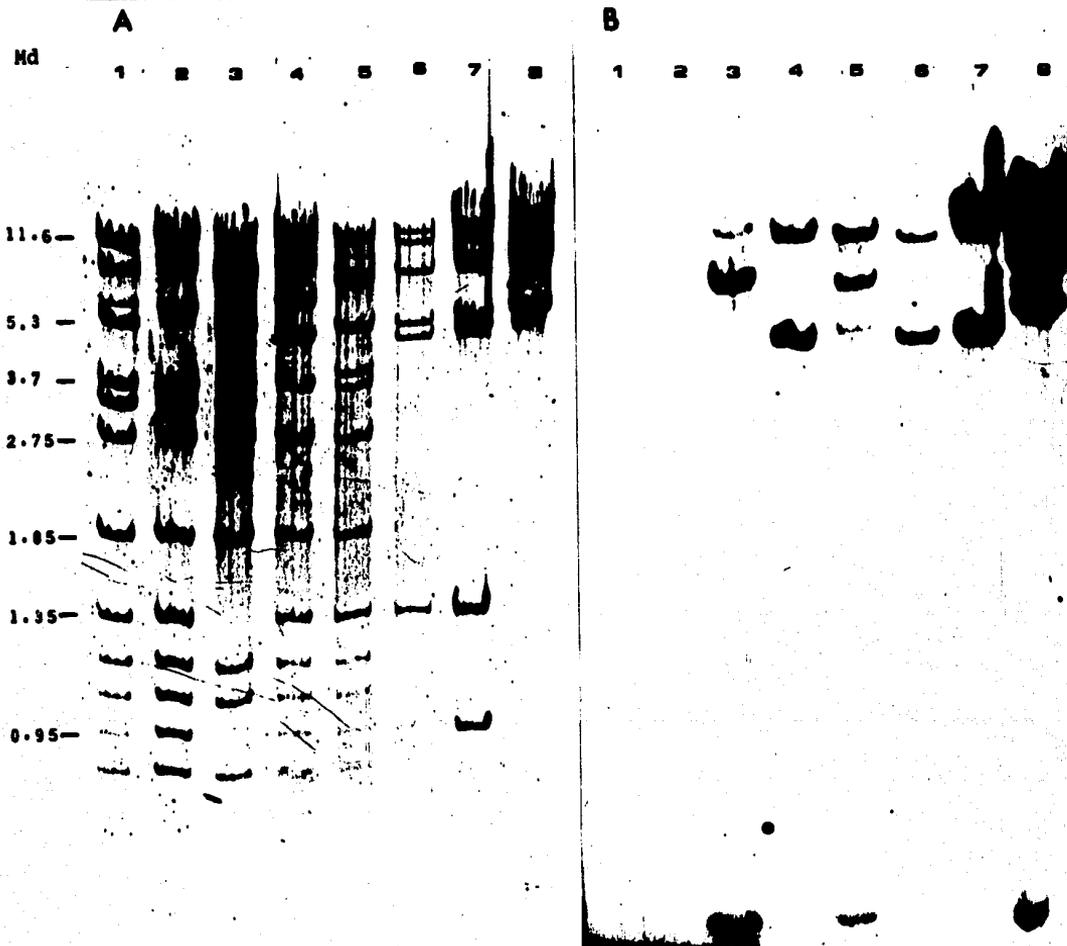


Figura 20.- Caracterización molecular de los plásmidos pRA135 (1), pRA115 (2), pR100-T (3), pRA131 (4), pRA111 (5) pRA136 (7) y pRA116 (8). A) Patrón de restricción con la enzima *EcoRI*. B) Autorradiografía de la transferencia tipo Southern del gel mostrado, después de la hibridización con el fragmento de *HincII* de 1275 pb del Th10.



Figura 21.- Caracterización molecular de los plásmidos pRA116 (1), pRA115 (2), pR100-T (3), pRA131 (4), pRA111 (5), pRTF-2 (6), pRA136 (7), pRA135 (8). A) Patrón de restricción de la doble digestión *EcoRI/SalI*, B) Autorradiografía de la transferencia tipo Southern del gel mostrado, después de la hibridización con el monitor del *Tn10*.

EcoRI

pRTF-2	pR100-T	pRA111	pRA115	pRA116
---	---	---	---	A(16.5)*●
A1(14.5)*	---	---	---	---
---	---	A(13.5)*	A(13.5)*	---
A2(12.5)●	---	B(12.8)●	---	---
---	A(12.16)*○	C(12.5)*●	---	---
---	---	---	B(11.6)	---
---	---	---	---	B(10.3)●
---	---	---	---	C(10.3)●
---	---	---	C(9.1)	---
C(8.5)	---	D(8.5)	---	---
---	B(8.0)	E(8.1)	---	---
---	D(7.2)●	F(7.6)●	---	---
---	---	---	---	D(6.4)●
---	---	---	D(5.8)*	---
---	E(5.25)	---	---	---
---	F(5.2)	---	---	---
D(5.1)	---	G(5.15)	---	---
---	---	H(5.15)○	---	---
E1(4.8)●	---	---	---	---
---	---	I(3.96)*	---	---
---	G(3.7)	J(3.7)	---	---
---	H(3.28)*	---	E(3.28)*	---
---	I(2.75)	K(2.75)	F(2.75)	---
---	K(1.85)	L(1.85)	G(1.85)	---
E(1.35)	---	M(1.35)	H(1.35)	---
---	L(1.1)	N(1.1)	I(1.1)	---
---	M(1.0)	O(1.0)	J(1.0)	---
F(0.95)	---	P(0.95)	K(0.95)	---
---	N(0.75)	Q(0.75)	L(0.75)	---
---	O(0.35)●	R(0.35)●	---	E(0.35)●
47.7	52.59	91.05	53.03	43.85

Figura 22.- Diagrama esquemático de los patrones de restricción de los plásmidos pRA111, pRA115 y pRA116 con la enzima EcoRI, obtenidos de la Figuras 18 y 20. Los números corresponden a los pesos moleculares en Md de los fragmentos. (\*) y (●) indican los fragmentos que hibridizan con los monitores para la IS1 y Tn10, respectivamente. (○) indica hibridización débil con el monitor del Tn10.

**EcoRI/SAL I**

pRTF-2	pR100-T	pRA111	pRA115	pRA116
--	--	--	--	A(13.7)●
--	A(12.16)*○	A(12.16)*●	--	--
A1(9.95)	--	B(10.02)	--	--
--	--	--	A(9.2)*	--
--	--	--	--	B(8.3)●
--	B(7.2)●	C(7.25)●	--	--
B(7.1)	--	D(7.1)	B(6.9)	--
C(5.8)	--	E(5.75)	C(5.7)	--
--	--	--	D(5.7)*	--
--	--	--	--	C(5.6)●
--	--	--	--	D(5.6)
--	C(5.25)	--	--	--
--	D(5.2)	--	--	--
D(5.1)	--	F(5.15)	--	--
--	--	G(5.15)○	--	--
E1(4.8)●	--	--	--	--
--	E(4.65)	--	--	--
--	--	H(4.05)●	--	--
--	--	I(3.95)*	--	--
--	--	J(3.95)	--	--
--	G(3.28)*	--	E(3.28)*	--
E2(3.1)●	--	--	--	E(3.1)●
E3(3.0)*	--	--	--	F(3.0)*
--	--	K(3.0)*○	--	--
--	H(2.9)	L(2.9)	F(2.9)	--
--	I(2.75)	M(2.75)	G(2.75)	--
E(2.4)	--	N(2.4)	--	G(2.4)
--	K(2.39)	O(2.39)	H(2.39)	--
F(2.0)	--	P(2.0)	I(2.0)	--
--	M(1.9)	--	J(1.9)	--
--	N(1.85)	Q(1.85)	K(1.85)	--
H(1.8)	--	R(1.8)	L(1.8)	--
I(1.4)	--	S(1.4)	M(1.4)	--
J(1.35)	--	T(1.35)	N(1.35)	--
--	O(1.33)	--	--	--
--	Q(1.1)	U(1.1)	O(1.1)	--
--	R(1.0)	V(1.0)	P(1.0)	--
K(0.95)	--	W(0.95)	Q(0.95)	--
--	S(0.75)	X(0.75)	R(0.75)	--
--	T(0.6)	Y(0.6)	S(0.6)	--
--	U(0.4)	Z(0.4)	--	H(0.4)
--	V(0.35)●	Z(0.35)●	--	I(0.35)●
48.75	55.06	91.52	53.52	42.53

Figura 23.- Diagrama esquemático de los patrones de restricción de los plásmidos pRA111, pRA115 y pRA116 para la doble digestión EcoRI/SalI. Los números corresponden a los pesos moleculares en Md. Para los símbolos ver Figura 22.

los cuales son: a) un evento de recombinación a nivel del Tn<sub>10</sub>, ya que los fragmentos de EcoRI/SalI E1 y E2 del pRTF-2 y el fragmento A del pR100-T (que hibridizan con el Tn<sub>10</sub>), producen en el pRA111 los fragmentos de EcoRI/SalI A y H, que hibridizan fuertemente con el Tn<sub>10</sub> y los fragmentos G y K que hibridizan débilmente con el monitor del Tn<sub>10</sub>, b) un evento de recombinación cerca ó dentro de una IS<sub>1</sub>, debido a que el fragmento de EcoRI/SalI E3 (con IS<sub>1</sub>) del pRTF-2 y la región del pR100-T constituida por los fragmentos G (con IS<sub>1</sub>) y M no se encuentran en el pRA111, pero hay dos fragmentos nuevos con la secuencia IS<sub>1</sub> (fragmentos de EcoRI/SalI I y K), c) una -delección de los fragmentos de EcoRI/SalI C, D, E y O del pR100-T que produce el fragmento J de EcoRI/SalI en el pRA111.

El plásmido pRA115 de aproximadamente 53 Md, presenta muchos fragmentos generados por las enzimas de restricción, similares en peso molecular a los generados por las mismas enzimas en el pRA111 (Figura 22 y 23), además contiene 3 secuencias de inserción IS<sub>1</sub> localizadas en los fragmentos de EcoRI/SalI A, D y E (Figura 19 carril 2 y Figura 23). Sin embargo, tiene las siguientes diferencias con el pRA111; a) no tiene ningún fragmento que hibridice con el monitor del Tn<sub>10</sub> (Figura 20 carril 2), b) los fragmentos de EcoRI/SalI E (con IS<sub>1</sub>) y J del pRA115 no se encuentran en el plásmido pRA111, pero corresponden a fragmentos del plásmido pRTF-2 (Figura 23), c) los fragmentos de EcoRI/SalI A (con IS<sub>1</sub>), B y D (con IS<sub>1</sub>) del pRA115 no se encuentran en los plásmidos pRTF-2, pR100-T ó pRA111, indicando que son fragmentos nuevos (Figura 23). - Estos datos sugieren que el plásmido pRA115 es un derivado del pRA111, generado por eventos de recombinación intramoleculares. Un evento posiblemente ocurrió cerca o dentro de la IS<sub>1</sub>, ya que algunos fragmentos con IS<sub>1</sub> cambian de tamaño, mientras que los otros fragmentos nuevos nos sugiere uno ó dos eventos más de recombinación.

El plásmido pRA116 ( $Km^R Tc^R$ ) de aproximadamente 43 Md,

generó 5 fragmentos con EcoRI (Figura 22) y 9 fragmentos con EcoRI/SalI (Figura 23), este plásmido tiene: a) una secuencia IS1 en el fragmento de EcoRI/SalI F, que corresponde en peso molecular al fragmento E3 del pRTF-2 (Figura 19 carril 1 y Figura 23), b) cinco fragmentos que hibridizan con el monitor del Tn10 (fragmentos A, B, C, D, E de EcoRI ó fragmentos A, B, C, E, I de EcoRI/SalI) (Figura 20 carril 8 y Figura 21 carril 1). c) los fragmentos de EcoRI/SalI del pRA116 E (con Tn10) y F (con IS1) no se encuentran en el pRA111, pero son idénticos a los fragmentos E2 y E3 del pRTF-2 (Figura 23). El plásmido pRA116 parece ser un derivado del pRA111, básicamente por presentar varios fragmentos que hibridizan con el monitor del Tn10, que sugieren la existencia de dos genes de resistencia a Tc.

El plásmido pRA131 ( $Mer^r$   $Cm^r$   $Sm^r$ - $Sp^r$   $Su^r$ - $Km^r$   $Tc^r$ ), tiene un peso molecular aproximado de 74 Md y presenta las siguientes características: a) muchos de los fragmentos generados por las enzimas de restricción en el pRA131, son similares en peso molecular a fragmentos generados por las mismas enzimas en los plásmidos pRTF- y pR100-T (Figura 24 y 25), -- b) los fragmentos de EcoRI/SalI A, B y D son bandas nuevas que no se encuentran en los plásmidos pRTF-2 ó pR100-T (Figura 25), c) los fragmentos de EcoRI/SalI A1 y D del pRTF-2 y los fragmentos A, B, C, D, E, G, M, O, U y V del pR100-T no se encuentran en el plásmido pRA131 (Figura 25), d) tiene dos secuencia IS1 localizadas en los fragmentos de EcoRI/SalI -- B y H (Figura 19 carril 4 y Figura 25).

En base al análisis de los patrones de restricción e hibridizaciones con los monitores, podemos suponer que el plásmido pRA131 está formado por el plásmido pRTF-2 y parte del pR100-T (región del r-det y el fragmento L de EcoRI/SalI del RTF). Es posible que este plásmido se haya generado por dos eventos de recombinación, el primero una recombinación entre los dos plásmidos para formar el cointegrado, y el segundo una delección de casi toda la región RTF del pR100-T.

# EcoRI

pRF-2	pR100-T	pRA131	pRA135	pRA136
A1(14.5)*	--	A(14.05)*	--	A(14.0)*
A2(12.5)●	--	B(12.2)●	--	--
--	A(12.16)*○	--	--	--
--	--	C(12.0)*	--	--
--	--	--	A(11.6)*	--
--	--	--	B(11.0)	--
--	--	--	--	B(10.2)●
--	--	--	C(9.1)	--
C(8.5)	--	D(8.5)	--	C(8.7)
--	B(8.0)	--	--	--
--	D(7.2)●	--	--	--
--	--	E(6.5)	--	--
--	--	--	--	D(5.95)
--	E(5.25)	--	D(5.3)	--
--	F(5.2)	--	--	--
--	--	--	--	--
D(5.1)	--	--	--	--
E1(4.8)●	--	F(4.7)●	--	E(4.9)●
--	G(3.7)	G(3.7)	E(3.7)	--
--	H(3.28)*	--	F(3.28)*	--
--	I(2.75)	H(2.75)	G(2.75)	--
--	K(1.85)	I(1.85)	H(1.85)	--
E(1.35)	--	J(1.35)	I(1.35)	K(1.35)
--	L(1.1)	K(1.1)	J(1.1)	--
--	M(1.0)	L(1.0)	K(1.0)	--
F(0.95)	--	M(0.95)	L(0.95)	G(0.95)
--	N(0.75)	N(0.75)	M(0.75)	--
--	O(0.35)●	--	--	--
47.7	52.59	71.4	53.73	46.05

Figura 24.- Diagrama esquemático de los patrones de restricción de los plásmidos pRA131, pRA135 y pRA136 con la enzima EcoRI, obtenidos de las Figuras 18 y 20. Los números corresponden a los pesos moleculares en Md. Para los símbolos ver Figura 22.

EcoRI/SAL I

pRIF-2	pR100-T	pRA131	pRA135	pRA136
--	A(12.16)* <sup>o</sup>	A(12.2)	--	--
A1(9.95)	--	--	--	A(9.6)
--	B(7.2)*	B(9.45)*	A(9.45)*	--
B(7.1)	--	--	--	--
--	C(5.25)	C(7.1)	B(7.1)	B(7.1)
C(5.8)	D(5.2)	D(5.9)	--	--
--	--	E(5.75)	C(5.75)	C(5.75)
D(5.1)	E(4.65)	--	--	--
E1(4.8)*	G(3.28)*	F(4.7)*	D(5.1)	D(5.1)
--	--	--	--	E(4.7)*
E2(3.1)*	--	G(3.1)*	E(3.25)*	--
E3(3.0)*	--	H(3.0)*	--	F(3.1)*
--	H(2.9)	I(2.9)	--	G(3.0)*
--	I(2.75)	J(2.75)	F(2.9)	--
E(2.4)	--	K(2.4)	G(2.75)	--
--	K(2.39)	L(2.39)	H(2.4)	H(2.4)
F(2.0)	--	M(2.0)	I(2.0)	I(2.0)
--	M(1.9)	--	J(1.9)	--
--	N(1.85)	N(1.85)	K(1.85)	--
H(1.8)	--	O(1.8)	L(1.8)	J(1.8)
I(1.4)	--	P(1.4)	M(1.4)	K(1.4)
J(1.35)	--	Q(1.35)	N(1.35)	L(1.35)
--	O(1.33)	--	--	--
--	Q(1.1)	R(1.1)	O(1.1)	--
--	R(1.0)	S(1.0)	P(1.0)	--
K(0.95)	--	T(0.95)	Q(0.95)	M(0.95)
--	S(0.75)	U(0.75)	R(0.75)	--
--	T(0.6)	V(0.6)	S(0.6)	--
--	U(0.4)	--	--	--
--	V(0.35)*	--	--	--
48.75	55.06	74.4	53.4	48.25

Figura 25.- Diagrama esquemático de los patrones de restricción de los plásmidos pRA131, pRA135 y pRA136 con la doble digestión EcoRI/SalI, obtenidos de las Figuras 19 y 21. Los números en parentesis son los pesos moleculares en Md. Para los símbolos ver Figura 22.

El plásmido pRA135 ( $\text{Mer}^r$   $\text{Cm}^r$   $\text{Sm}^r$ - $\text{Sp}^r$   $\text{Su}^r$ ) de 53.5 Md, tiene las siguientes características: a) todos los fragmentos generados con la digestión EcoRI/SalI corresponden a fragmentos del pRA131 producidos por las mismas enzimas, con excepción de los fragmentos D, E y J que no están presentes; sin embargo corresponden a fragmentos generados en los plásmidos pRTF-2 y pR100-T (Figura 25). El análisis comparativo sugiere que el plásmido pRA135 es un derivado del pRA131, que se produjo por una deleción que involucró a los fragmentos de EcoRI/SalI A, D, F, G, H y L del pRA131, y la aparición de los fragmentos D, E y J en el plásmido pRA135.

El plásmido pRA136 ( $\text{Km}^r$  $\text{Tc}^r$ ) de 48 Md, presentó patrones de restricción idénticos a los del plásmido pRTF-2, y las hibridizaciones muestran una secuencia IS1 (Figura 18 carril 8) y dos fragmentos que hibridizan con el gene tet del Tn10 (Figura 21 carril 7) (ver Figura 25). Es posible que este plásmido se haya generado por recombinación homóloga entre las IS1, deletandose así la región del plásmido pR100-T.

## DISCUSION

En este trabajo se estudió la formación de rearrreglos genéticos de dos plásmidos del grupo de incompatibilidad IncFII, en diferentes sistemas de recombinación de E. coli (sistemas - RecBC, RecF y RecE). Los plásmidos utilizados (pRTF-2 y pR100-T) presentan varias regiones con gran homología, como es la mayor parte del RTF y las secuencias IS<sub>1</sub>. La formación de rearrreglos moleculares entre estos plásmidos, puede estar mediada por recombinación homóloga o por eventos inducidos por los elementos transponibles (IS<sub>1</sub>, IS<sub>2</sub>, Tn<sub>5</sub>, Tn<sub>10</sub>, y Tn<sub>21</sub>).

Para realizar este estudio se diseñó una estrategia experimental que permitió seleccionar bacterias con rearrreglos genéticos y cuantificar la frecuencia de estos eventos en diferentes condiciones de recombinación. La estrategia consistió en; a) obtener dos plásmidos incompatibles con marcadores de resistencia diferentes y con regiones homólogas, uno de ellos formado por el RTF del R1-19 y el otro con las regiones RTF y r-det del R100. Ambos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad y b) un protocolo experimental que permitió la selección, cuantificación e identificación de bacterias con rearrreglos genéticos.

### 1.- Construcción de plásmidos.

Inicialmente se planeó la construcción de un plásmido formado por el RTF del R1-19 con un marcador de resistencia incapaz de transponer. Sin embargo, las dificultades metodológicas para la clonación de un gene de resistencia en un plásmido del tamaño del RTF (39.1 Md), obligaron a seguir por una vía alternativa, que fué la introducción de dos transposones (Tn<sub>5</sub> y Tn<sub>10</sub>) en el RTF del R1-19, para formar el plásmido --- pRTF-2. En el caso de tener el RTF con un transposón, un gran número de células con un plásmido seleccionadas en el medio -

MDR, podrían ser células con el plásmido pR100-T con ese transposón; esto impediría la detección de otro tipo de rearrreglos cuya frecuencia fuera menor a la de transposición. La existencia de los dos transposones en el plásmido, que tienen una frecuencia de transposición simultánea de  $1 \times 10^{-9}$ , en cepas recA<sup>-</sup> permite que cualquier evento de recombinación menor o igual a  $1 \times 10^{-9}$  sea seleccionable fenotípicamente.

El análisis de los patrones de restricción con EcoRI, SalI y EcoRI/SalI y de los resultados de las hibridizaciones tipo Southern con sondas para IS1 y tet (Tn10) de los plásmidos R100 y pR100-T, mostró que: a) el R100 utilizado en este trabajo no es igual al NR1 (R100) descrito por el grupo de R. Rownd (42, 43). El plásmido utilizado por nosotros es aproximadamente 5.0 Md mayor que el NR1 y contiene una secuencia extra de IS1; sin embargo, la mayor parte del RTF y r-det son similares en ambos plásmidos y b) el plásmido Tc<sup>S</sup> (pR100-T) derivado del R100, no se generó por la excisión del Tn10, sino por un rearrreglo molecular en la región tet del Tn10, además de presentar una delección de aproximadamente 9.5 Md, que incluyó la copia extra de IS1. Esta delección pudo generarse por recombinación entre dos IS1, ya que este tipo de eventos están incrementados en cepas dam<sup>-</sup>. Sin embargo, los resultados de los patrones de restricción y de las hibridizaciones tipo Southern, no permiten sustentar esta conclusión.

La presencia de rearrreglos moleculares, delecciones o inserciones de DNA en plásmidos tipo R100 ha sido descrita (43). Algunos plásmidos presentan un inserto de 0.75 Md en la región RTF, que no afecta los genes de resistencia a antibióticos, mientras que plásmidos Tc<sup>S</sup> derivados del NR1, se demostró la presencia de una delección que no corresponde en peso molecular a la excisión del Tn10; sin embargo, no se estudió si el gene tet había sufrido un rearrreglo molecular.

El hecho de que el R100 utilizado no presentó un patrón de restricción igual al NR1 y de que el pR100-T se generó

por un evento complejo, impidió conocer el mapa de restricción completo del pR100-T. El carecer de este mapa, dificultó el estudio de la estructura molecular de los plásmidos con rearrreglos moleculares; sin embargo, no impidió cubrir los principales objetivos de este trabajo.

## 2.- Cuantificación de compatibilidad y frecuencia de rearrreglos genéticos.

Se estudió la frecuencia y el tipo de rearrreglos genéticos entre los plásmidos pRTF-2 y pR100-T en las cepas AB1157, JC2924, JC7623 y JC9604. Estas cepas permiten tener los tres principales sistemas de recombinación en E. coli: RecBC, RecF, y RecE.

Para la estrategia experimental de selección de células con rearrreglos genéticos, se utilizó la propiedad de incompatibilidad entre los plásmidos pRTF-2 y pR100-T, la cual permite la coexistencia transitoria de los dos plásmidos dentro de una célula y una posterior eliminación de uno de los dos -- plásmidos de la célula, generando así una población celular que contiene un sólo plásmido.

En las Figuras 12 y 13 se muestran los resultados de los experimentos para medir la cinética de pérdida de diferentes marcadores de resistencia en las células que originalmente contenían al pR100-T ( $Cm^R$ ) y pRTF-2 ( $Km^R Tc^R$ ). Para las cuatro cepas estudiadas, el número de células con el fenotipo  $Cm^R$  o  $Km^R Tc^R$  tiende a llegar al 50% (Figura 12), lo que puede significar que durante la expresión de incompatibilidad no existe ventaja selectiva de un plásmido sobre el otro. Además, el valor obtenido para el factor de compatibilidad, es similar en las cuatro cepas y concuerda con el reportado para este tipo de plásmidos por Uhlin & Norsdtröm (59) (Tabla 3).

En las cepas que tienen un sistema activo de recombinación (AB1157, JC7623 y JC9604), el número de células que crecen en  $CmKm$  o  $CmTc$  es mayor que el de MDR (Figura 12), mientras

que en la cepa JC2924, el número de células en estos medios es similar. Esta diferencia parece que se debe a un mayor número de eventos de recombinación en las cepas AB1157, JC7623 y -- JC9604, que causa que los marcadores  $Km^r$  y  $Tc^r$  originalmente presentes en el pRTF-2 se encuentren ahora en moléculas diferentes en una gran número de células.

En la Figura 13 se observa que el número de células capaces de crecer en medio MDR disminuye en función del tiempo; sin embargo, la cinética del fenómeno es diferente en las cuatro cepas. Esta diferencia puede deberse a que incompatibilidad se expresa de manera diferente o a que el número de rearreglos genéticos es diferente en cada una de las cepas. Sin embargo, como se discutió, la incompatibilidad se expresa de manera similar en las cuatro cepas, por lo que es más probable que estas diferencias obedezcan a una frecuencia diferente de generación de rearreglos genéticos en estas cepas.

La tabla 3 muestra los valores promedio de las frecuencias de rearreglos genéticos de las cuatro cepas. En la cepa AB1157 (silvestre) se encontró que el rearreglo genético que ocurre con una frecuencia de  $2.4 \times 10^{-6}$  fué la formación de un plásmido mayor de 70 Md, cuyo fenotipo es  $Mer^r Cm^r Sm^r Sp^r Su^r Km^r Tc^r$ . Este cointegrado es inestable en la cepa silvestre generando por recombinación varios plásmidos; los más frecuentes confieren resistencia a Mer Cm Sm-Sp Su y a Km Tc y presentan un peso molecular similar al del pR100-T y pRTF-2, respectivamente. La inestabilidad del cointegrado produce que en la cepa silvestre se observe un patrón electroforético de 3 plásmidos (Figura 14A y Figura 16 carril 2), lo cual sugiere que la recombinación intramolecular se realiza en sitios preferenciales. En el caso de que los cointegrados generaran plásmidos con pesos moleculares heterogéneos por la recombinación entre secuencias homólogas diferentes y que la generación de estos plásmidos se presentara con una frecuencia equivalente, no se hubiera observado en la cepa AB1157 el patrón electroforético de tres bandas definidas, sino una banda definida de alto

peso molecular y un barrido difuso por abajo de ésta. En la cepa recA<sup>-</sup> el cointegrado es estable (Figura 16 carril 3).

En la cepa JC7623 (RecF<sup>+</sup>) los rearrreglos genéticos fueron 50 veces más frecuentes que en la cepa silvestre; estos rearrreglos fueron principalmente de dos tipos: a) plásmido-cromosoma y b) plásmido-plásmido (ver Resultados 2 ). El primer tipo de rearrreglos se presentó en las células con fenotipo  $Cm^R$   $Sm^R$ - $Sp^R$   $Km^R$   $Tc^R$  que tenían un plásmido de tamaño similar al pR100-T, pero que por conjugación únicamente transfirió  $Cm^R$  -  $Sm^R$ - $Sp^R$ . En estas células los marcadores  $Km^R$   $Tc^R$  se encuentran en el cromosoma. Los marcadores originalmente presentes en el pRTF-2, pudieron movilizarse al cromosoma ya sea por integración del pRTF-2 o por transposición. Entre las colonias  $Cm^R$ - $Sm^R$ - $Sp^R$   $Km^R$   $Tc^R$  seleccionadas de la cepa JC7623 se observan -- también células con un posible plásmido inferior a 30 Md. En este caso no fue posible transferir por conjugación algún marcador genético. Por lo tanto y considerando el tamaño del -- plásmido, es posible que algunos marcadores se localizen en el plásmido que ahora ya no es conjugativo y los otros en el cromosoma, o bien, aunque con menos probabilidad, es que todos se encuentren en el plásmido o en el cromosoma. El segundo tipo de rearrreglos de la cepa JC7623 se observó en las células  $Cm^R$   $Sm^R$ - $Sp^R$   $Km^R$   $Tc^R$  que presentaron, el patrón de tres bandas o bien el de una sola de aproximadamente 60 Md, pero que por conjugación transfirieron todos los marcadores. En el primer caso, el rearrreglo generó un cointegrado (recombinación plásmido-plásmido) inestable, similar a los observados en la cepa silvestre. El plásmido de 60 Md pudo generarse por transposición del r-det al pRTF-2 ó por transposición del Tn<sub>5</sub> y Tn<sub>10</sub> al pR100-T ó por recombinación de los dos plásmidos y una deleción de una región de aproximadamente 45 Md.

En las cepas JC2924 (recA<sup>-</sup>) y JC9604 (RecE<sup>+</sup>, en condiciones recA<sup>-</sup>), los rearrreglos genéticos fueron  $10^5$  y  $10^3$  veces menos frecuentes que en la cepa silvestre (Tabla 3). En estas dos cepas el rearrreglo fue la integración de pR100-T al

cromosoma, mientras que el pRTF-2 se mantuvo como elemento extracromosomal. Se ha descrito que la recombinación intermolecular de plásmidos chicos (tipo pBR322) en el sistema  $\text{RecE}^+$  en condiciones  $\text{recA}^-$ , solo disminuye 10 veces con respecto a la silvestre (Tabla 2). Sin embargo, en este trabajo la recombinación intermolecular de plásmidos grandes no se logró detectar. Esta diferencia puede deberse a que en plásmidos chicos (tipo pBR322) hay un mayor número de moléculas por célula, lo cual permite tener un mayor número de eventos de recombinación o bien a que los plásmidos grandes codifiquen proteínas que afecten la recombinación de plásmidos; por ejemplo, se ha descrito una exonucleasa ATP-dependiente codificada por el R1-19 que afecta la frecuencia de recombinación post-conjugacional, en algunas mutantes ésta aumenta, mientras en otras disminuye (40).

Es interesante puntualizar, que mientras en la cepa AB1157 únicamente se observaron rearreglos genéticos plásmido-plásmido que generan cointegrados inestables, en la cepa JC7623 se observaron diferentes tipos de rearreglos y con frecuencia relativamente alta rearreglos plásmido-cromosoma y en la cepa JC9604 solo hay eventos plásmido-cromosoma. Es posible que en condiciones  $\text{RecBC}^- \text{RecF}^+$  (JC7623) se incrementen los eventos de transposición y/o recombinación plásmido-cromosoma, mientras que en condiciones  $\text{RecE}^+ \text{recA}^-$ , solo existen eventos de recombinación plásmido-cromosoma. A la fecha, únicamente se ha reportado las frecuencias de recombinación para plásmidos pequeños (37). Sería por lo tanto interesante estudiar las frecuencias de transposición plásmido-plásmido y plásmido-cromosoma y de formación de células Hfr en las cepas JC7623 y JC9604.

### 3.- Análisis molecular de rearreglos genéticos.

De los rearreglos genéticos plasmídicos sólo se analizaron algunos de los generados en la cepa AB1157 (silvestre) ya que estos fueron de un tipo, mientras que en la cepa JC7623

(RECF<sup>+</sup>) se generó un gran número de rearrreglos heterogéneos, lo que hizo difícil seleccionar uno que fuera característico de esta cepa. Además el tipo seleccionado también se presentó en la cepa JC7623 y presenta el atractivo de su inestabilidad molecular.

Se aislaron seis plásmidos de la cepa silvestre a partir de dos colonias de experimentos diferentes. El pRA111 (Mer Cm Sm-Sp Km Tc) y sus derivados pRA115 (Mer Cm Sm-Sp) y pRA116 (Km Tc) se aislaron de una colonia y de la otra, el plásmido pRA131 (Mer Cm Sm-Sp Km Tc) y sus derivados pRA135 (Mer Cm Sm-Sp) y pRA136 (Km Tc). Estos plásmidos se analizaron con las enzimas de restricción SalI y EcoRI y con hibridizaciones tipo Southern con los monitores para IS1 y tet (Tn10).

El plásmido pRA111 de aproximadamente 91,5 Md, contiene tres secuencias de inserción IS1 (Figura 19 carril 5) y varios fragmentos que hibridizan con el gene tet del Tn10 (Figura 21 carril 5). Por el número de fragmentos que tienen regiones del gene tet (ya que el monitor de éste sólo contiene un sitio interno de EcoRI), podemos deducir que hay dos genes tet en este plásmido. Este plásmido es un cointegrado de los plásmidos pRTF-2 y pR100-T, ya que muchos de los fragmentos de los plásmidos originales se encuentran en el pRA111 (Figuras 22 y 23). Sin embargo, se generó por varios eventos moleculares y no por evento sencillo de recombinación, los cuales son; a) un evento de recombinación cerca o dentro de la IS1, b) una recombinación en la región tet del Tn10, y c) una recombinación que produce una delección de aproximadamente 12 Md del RTF del pR100-T (ver Resultados 2). De los eventos a) y b) uno de ellos pudo inducir la formación de un cointegrado, mientras que el otro es probable que produjo una inversión.

El plásmido pRA115 (Mer Cm Sm-Sp) es de 53.5 Md, y tiene también 3 secuencias IS1 (Figura 19 carril 2 y Figura 23) y ninguna región que hibridice con el gene tet (Figura 20 y Figura 21 carril 2). Se puede decir, en base al número de secuen

cias IS1, que este plásmido se generó por recombinación intramolecular del pRA111. Además, parece que también se generó -- por varios eventos, de los cuales posiblemente uno, involucró a las secuencias IS1 (ver Resultados 2).

El plásmido pRA116 de 42.5 Md, tiene una secuencia de inserción IS1 (Figura 19 carril 1) y presenta 5 fragmentos que contienen parte del gene tet (Figura 21 carril 1), lo que significa que hay dos genes tet. Para este plásmido la aparición de varios fragmentos que hibridizan con el gene tet que o se encuentran en el pRA111 y la aparición de un fragmento nuevo que tiene la IS1, sugieren dos eventos moleculares de recombinación.

El plásmido pRA131 de 71.4 Md, tiene características diferentes al pRA111 en cuanto al número de secuencias IS1 y genes tet, además de tener un peso molecular diferente. Este plásmido posiblemente se generó por un evento de recombinación cerca o dentro de las IS1, produciendo la cointegración de los plásmidos pRTF-2 y pR100-T y un segundo evento que incluyó casi toda la región RTF del pR100-T. Uno de los datos que apoyan la cointegración es que en el plásmido pRA135 derivado pRA131, reaparece un fragmento similar al fragmento de EcoRI/SalI M del pR100-T, el cual es parte del RTF (Figura 25). Por otro lado se descarta la posibilidad de que sea un producto de la transposición del r-det al pRTF-2 por el número de secuencias IS1.

El plásmido pRA135 de 53.7 Md, tiene dos secuencias de inserción IS1 (Figura 19 carril 8) y ningún gene tet (Figura 21 carril 8). Un evento de recombinación generó en este -- plásmido la aparición del fragmento de EcoRI F que tiene una secuencia IS1 (Figura 18 carril 1); este fragmento no se encuentra en el pRA131 pero sí en el pR100-T. Este evento que ocurrió cerca o dentro de la secuencia IS1 pudo producir la delección de la región que contenía al Tn5 y Tn10.

El plásmido pRA136 de 48.2 Md, presentó patrones de restricción y de hibridización con IS1 y tet similares a los

del plásmido pRTF-2 (Figuras 18, 19, 20, 21). En este plásmido los fragmentos de EcoRI/SalI A y D son nuevos ya que no se encuentran en el pRA131, pero sí en el pRTF-2, lo cual sugiere que estos fragmentos estuvieron involucrados en la generación del pRA116.

Los plásmidos pRA111 y pRA131 se generaron por varios eventos de recombinación simultáneos o sucesivos. El resultado de estos eventos fué la formación de cointegrados que presentan además deleciones y otros rearrreglos genéticos. Es posible que estos eventos de recombinación hayan involucrado a las secuencias IS1 o a secuencias adyacentes. Por ejemplo, tanto en el plásmido pRA111, como en el pRA131, el fragmento H de EcoRI del pR100-T que contiene una IS1 cambia de peso molecular (Figura 18). Además, en el caso de los dos plásmidos derivados pRA115 y pRA135, aparece un fragmento de EcoRI similar al fragmento H del pR100-T. Estos datos sugieren fuertemente que tanto la generación de los cointegrados (aislados de experimentos diferentes), como sus derivados, fueron generados por recombinación mediada por las secuencias IS1. En un sistema experimental diferente, el grupo de R. Rownd (48) encontró que la recombinación interplásmido de secuencias homólogas del NR1 (una secuencia en NR1 y la otra en un plásmido multicopia), las secuencias IS1 no eran sitios preferenciales de recombinación.

Por otro lado, en los plásmidos pRA115 y pRA135 derivados de los plásmidos pRA111 y pRA131 por recombinación intramolecular, se puede observar que en ambos reaparecen dos fragmentos de EcoRI/SalI ( G con IS1 y M del pR100-T) que se encuentran adyacentes en el pR100-T. Este resultado podría deberse a que en el proceso de recombinación se forman moléculas híbridas (heteroduplex) dinámicas, las cuales podrían afectar más de un fragmento generado por las enzimas de restricción.

En resumen podemos decir que: a) en la cepa AB1157 (vía RecBC) los rearrreglos genéticos ocurren con una frecuencia de  $10^{-6}$ , que son la formación de cointegrados, posiblemente generados por recombinación intermolecular de IS1 (ver Figura 26), b) en la cepa JC7623 (RecF<sup>+</sup>), los rearrreglos genéticos

VIA DE RECOMBINACION	EVENTO MOLECULAR
RecBC (AB1157)	plásmido- plásmido (cointegrado)
RecF <sup>+</sup> (JC7623)	plásmido- plásmido (cointegrado u otro tipo de evento) plásmido- cromosoma (integración del pRTF-2 ó transposición del Tn5 y Tn10)
RecE <sup>+</sup> (JC9604)	plásmido- cromosoma (integración del pR100-T)
RecA <sup>-</sup> (JC2924)	plásmido- cromosoma (integración del pR100-T)

Figura 26.- Eventos moleculares observados en células con los plásmidos pRTF-2 y pR100-T en diferentes sistemas de recombinación

fueron 50 veces más frecuentes que en la cepa AB1157. Sin embargo, los rearrreglos interplasmídicos observados fueron muy heterogéneos, además se encontraron eventos plásmido-cromosoma, y c) en las cepas JC9604 (RecE<sup>+</sup>, en condiciones recA<sup>-</sup>) y -- JC2924 (recA<sup>-</sup>), los rearrreglos fueron producto de la integración del pR100-T al cromosoma, que ocurren a muy baja frecuencia.

Cabe mencionar, que la heterogeneidad y la alta frecuencia de los eventos de recombinación en condiciones RecF<sup>+</sup>, podrían deberse a un mayor número de secuencias "fre" en estos plásmidos, ya que si existieran un mayor número de secuencias "chi", la frecuencia de recombinación en la cepa AB1157 sería la más alta. Por otro lado, los transposones del pRTF-2 debe-

rían de transponer, con una frecuencia simultanea de  $1 \times 10^{-9}$ , sin embargo, en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, en la cepa recA<sup>-</sup>, no se logró detectar la transposición, sino la integración del pR100-T al cromosoma con una frecuencia de  $1 \times 10^{-11}$ . Esta diferencia puede deberse a que la transposición sea menos frecuente en estas condiciones o bien, a la forma matemática de obtener ésta frecuencia ( que se discute en el siguiente punto).

#### 4.- Otras consideraciones.

Los resultados presentados en esta trabajo permiten profundizar en el conocimiento de la dinámica molecular de -- plásmidos tipo R1-19 y R100, así como el conocimiento del papel que tienen los diferentes sistemas de recombinación de - E. coli en esta dinámica. Un objetivo importante de este trabajo fue la cuantificación de los eventos de recombinación -- que definen esta dinámica. La cuantificación requirió del di seño de una extrategia experimental y del desarrollo de una ecuación matemática que permitió calcular la frecuencia de rearrreglos genéticos por célula por doblaje celular ( $\alpha$ ). El análisis molecular de los plásmidos con rearrreglos mostró, por ejemplo, que la generación de un cointegrado involucró mas de un evento de recombinación; además, los cointegrados y posiblemente otros rearrreglos moleculares no son estables. Esto hace que la cuantificación que se realizó sea una aproximación al posible valor de  $\alpha$ . En el caso de la generación de rearrreglos genéticos por más de un evento y de que estos rearrreglos sean inestables el valor de  $\alpha$  calculado es menor al  $\alpha$  real. Hay que mencionar también que los valores reportados en este trabajo representan los eventos mínimos /célula/doblaje celular, mientras que la mayoría de los reportados en la literatura la frecuencia la representan como la relación de células con eventos/células totales en un tiempo de cultivo determinado. Este ultimo cálculo da el número de células con eventos pero no el número de eventos, ya que muchas de estas células

pudieron generarse por duplicaciones sucesivas de una célula donde se efectuó un evento de recombinación.

Sin embargo, la cuantificación de la frecuencia de rearreglos con las limitantes anteriormente mencionadas y el estudio de los rearreglos generados, permite comparar el efecto de los diferentes sistemas de recombinación en la generación de los rearreglos de los marcadores  $Cm^r$   $Km^r$  y  $Tc^r$  presentes en el pR100-T y pRTF-2. Además, para la selección de estos rearreglos plasmídicos se requirió relativamente poco tiempo de ---coexistencia de los dos plásmidos, pero en la naturaleza ---pueden existir muchos plásmidos que tengan regiones homólogas y que puedan coexistir más tiempo, lo cual permitiría que por recombinación se generara una gran diversidad de plásmidos.

ANEXO MATEMATICO

1.- Obtención de la formula de compatibilidad

En una población bacteriana, la cual tiene dos plásmidos incompatibles, podemos definir a  $\beta$  como la fracción celular que mantiene los dos plásmidos por doblaje celular;  $N_2(d)$  a la población con dos plásmidos en el doblaje celular  $d$ ;  $N_0$  a la población inicial con dos plásmidos y  $F$  al factor de dilución celular durante el experimento. Por lo tanto para:

$$\begin{array}{ll} d=0 & N_2(0) = N_0 \\ d=1 & N_2(1) = N_0 \beta \\ d=2 & N_2(2) = 2(2 N_0 \beta) \beta \end{array}$$

o sea que:

$$N_2(d) = 2^d N_0 \beta^d$$

considerando al factor de dilución celular

$$N_2(d)/ml = 2^d N_0 \beta^d F$$

a partir de esta ecuación podemos despejar  $\beta$ :

$$\beta = \log^{-1} \left[ \frac{1}{d} \log \frac{N_2(d)/ml}{2^d N_0 F} \right] \text{----- ( 1 )}$$

2.- Obtención de la formula de la frecuencia de rearrreglos genéticos.

Para poder obtener esta formula debemos suponer que los rearrreglos sólo se pueden realizar en células que mantienen ambos plásmidos. Podemos definir a  $\alpha$ , como la frecuencia de rearrreglos genéticos por doblaje celular que ocurren en una célula con dos plásmidos.  $N_r(d)$  representa a la población con -- rearrreglos genéticos en el doblaje celular  $d$ ;  $N_0$  a la población inicial con dos plásmidos,  $\beta$  al factor de compatibilidad y  $F$  al factor de dilución celular en el experimento, para:

$d=0 \quad N_r(0)=0$

$d=1 \quad N_r(1)= 2 N_0 \beta \alpha$

$d=2 \quad N_r(2)= 2(2 N_0 \beta \alpha) + 2^2 N_0 \beta^2 \alpha$

$d=3 \quad N_r(3)= 2|2(2 N_0 \beta \alpha) + 2^2 N_0 \beta^2 \alpha| + 2^3 N_0 \beta^3 \alpha$

por lo tanto

$N_r(d) = 2^d N_0 \beta \alpha + 2^d N_0 \beta^2 \alpha + 2^d N_0 \beta^3 \alpha + \dots + 2^d N_0 \beta^d \alpha$

o sea:

$$N_r(d) = 2^d N_0 \alpha \sum_{j=1}^d \beta^j$$

añadiendo el factor de dilución celular:

$$N_r(d)/ml = 2^d N_0 F \alpha \sum_{j=1}^d \beta^j$$

despejando  $\alpha$ :

$$\alpha = \frac{N_r(d)/ml}{2^d N_0 F \sum_{j=1}^d \beta^j} \quad \text{----- ( 2 )}$$

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Broda, P. (1979). Plasmid. W. H. Freeman & Company.
- 2.- Veltkamp, E. & Stuitje, R.A. (1981). Replication and structure of the bacteriocinogenic plasmids. CloDF13 and ColE1. Plasmid 5: 76-99.
- 3.- Rosen, J., Ryder, T., Ohtsubo, H. & Ohtsubo, E. (1981). Role of RNA transcripts in replication, incompatibility and copy number. Control in antibiotic resistance plasmids derivatives. Nature 290: 794-797.
- 4.- Nijkamp, H.J., van Gemen, B., Kakaart, M.J., van Putten, A. & Veltkamp, E. (1985). Stable maintenance of plasmid CloDF13: Structural and functional relationships between replication control, partitioning and incompatibility. pag. 283-298. En Helinski, D.R., Cohen, S.N., Clewel, D., Jackson, D.A. & Hollaender, A., (Eds.), " Plasmid in Bacteria ", Plenum Press.
- 5.- Rownd, R.H., Womble, P.D., Dong, X., Luckow, V.A. & Wi, P.R. (1985). Incompatibility and InFII plasmid replication control. pag. 335-354. En Helinski, D.R., Cohen, S.N., Clewel, D., Jackson, D.A. & Hollaender, A., (Eds.), " Plasmid in Bacteria", Plenum Press.
- 6.- Nielsen, P.F. & Molin, S. (1984). How the R1 replication control system responds to copy number deriviations. Plasmid 11: 264-267.
- 7.- Glass, R.E. (1982). Gene Funtion: E. coli and its heritable elements. University of California Press. U.S.A.
- 8.- Clark, A.J. & Margulis, A.D. (1965). Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Aca. Sci. 53(2): 451-459.
- 9.- Clark, A.J. (1973). Recombination deficient mutants of E. coli and other bacterias. Ann. Rev. Genet. 7: 67-86.

- 10.- Clark, A.J. (1974). Progress toward a metabolic interpretation of genetic recombination of Escherichia coli and bacteriophage lambda. Genetics 78: 259-271.
- 11.- Gudas, L.J. & Pardee, A.B. (1975). Model for regulation of Escherichia coli DNA repair functions. Proc. Natl. Aca. Sci. 72(6): 2330-2334.
- 12.- Brent, R, & Ptashe, M. (1981). Mechanism of action of the lexA gene product. Proc. Natl. Aca. Sci. 78(7): 4204-4208.
- 13.- Little, J.W., Mount, D.W. & Yanisch-Perron C.R. (1981). Purified lexA protein is a repressor of the recA and lexA genes. Proc. Natl. Aca. Sci. 78(7):4199-4203
- 14.- Cunningham, R.P., Das Gupta, C., Shibata, T. & Radding, C. M. (1980). Homologous pairing in genetic recombination: recA protein makes joint molecules of gapped circular DNA and closed circular DNA. Cell 20: 223-235
- 15.- Wu, A.M., Kahn, R., Das Gupta, C. & Radding C.M. (1982). Formation of nascent heteroduplex structures by RecA protein and DNA. Cell 30:37-44.
- 16.- Flory, J. & Radding, C.M. (1982). Visualization of RecA protein and its association with DNA: A priming effect of single strand binding protein. Cell 28: 747-756.
- 17.- Howard-Flanders, P., West, S.C. & Stasiak, A. (1984). Role of RecA protein spiral filaments in general recombination. Nature 309: 215-220.
- 18.- Ponticelli, A.S., Schultz, D.W., Taylor, F.A. & Smith, G.R. (1985). Chi-dependent DNA strand cleavage by RecBC enzyme. Cell 41:145-151
- 19.- Taylor, A.F, Schultz, D.W., Ponticelli, A.S. & Smith, G.R. (1985). RecBC enzyme niking at chi sites during DNA unwinding: Location and orientation-dependence of the cutting. Cell 41: 153-163.
- 20.- Muskavitch, M.T. & Linn. S. (1980). Electron microscopy of E. coli recBC enzyme reaction intermediates. pag. 901-908. En Alberts, B. (Ed.) "Mechanistic studies of DNA replication and genetic recombination", Academic Press Inc. U.S.A.

- 21.- Kaiser, D. & Murray, N.E. (1980). On the nature of sbcA mutations in E. coli K-12. Molec. Gen. Genet. 179: 555-563.
- 22.- Blonar, M.A., Sandles, S.J., Armengod, M.E., Ream, L.W. & Clark, A.J. (1984). Molecular analysis of the recF gene of Escherichia coli. Proc. Natl. Aca. Sci. 81: 4622-4626.
- 23.- Lovett, S.T. & Clark, A.J. (1983). Genetic analysis of regulation of the RecF pathway of recombination in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 153(3):1471-1478.
- 24.- Nakayama, H., Nakayama, K., Nakayama, R., Irino, N., Nakayama, Y. & Hanawalt, P. (1984). Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of Escherichia coli K-12: Identification a new mutant (recQ1) that blocks the RecF recombination pathway. Molec. Gen. Genet. 195:474-480.
- 25.- Krivonogov, S.V. & Novitskaja, V.A. (1984). A protein connected with the integrity of the recF gene in Escherichia coli K-12. Molec. Gen. Genet. 187: 302-304.
- 26.- Gillen, J.R., Wills, D.K. & Clark, A.J. (1981). Genetic analysis of the RecE pathway of genetic recombination in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 145(1): 521-532.
- 27.- Bresler, E.S., Goryshin, I.Y. & Lanzov, V.A. (1981). The process of general recombination in Escherichia coli K-12. Molec. Gen. Genet. 183: 139-143.
- 28.- Bresler, E.S., Krinovonogov, S.V. & Lanzov, V.A. (1981). Recombinational instability of F' plasmids in Escherichia coli K-12: Localization of fre-sites. Molec. Gen. Genet. 183: 192-196.
- 29.- Holliday, R. (1974). Molecular aspects of gene exchange and gene conversion. Genetics 78: 273-287.
- 30.- Whitehouse, K.L. (1982). Genetic recombination. John Wiley. U.S.A.
- 31.- Dressler, D. & Potter, H. (1982). Molecular mechanisms in genetic recombination. Ann. Rev. Biochem. 31:727-761.

- 32.- Kleckner, N. (1981). Transposable elements in prokariotes. *Ann. Rev. Genet.* 15: 341-404.
- 33.- West, S.C., Cassuto, E. & Howard-Flanders, P. (1981). Homologous pairing can occur before DNA strand separation in general genetic recombination. *Nature* 290: 29-33.
- 34.- Doherty, J.M., Morrison, T.P. & Kolodner, R. (1983). Genetic recombination of bacterial DNA: Physical and genetic analysis of the products of plasmid recombination in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 167: 539-560.
- 35.- Kolodner, R. (1980). Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: Electron m-croscopy analysis of in vitro intramolecular recombination. *Proc. Natl. Aca. Sci.* 77(8): 4847-4851.
- 36.- Cohen, A. & Laban, A. (1983). Plasmidic recombination in Escherichia coli K-12: The role of recF gene function. *Molec. Gen. Genet.* 189: 471-474.
- 37.- Cohen, A., Silberstein, Z., Broido, S. & Laban, A. (1985). General genetic recombination of bacterial plasmids. pag. 505-519. En Helinski, D.R., Cohen, S.N., Clewel, D.B., Jackson, D.A. & Hollaender, A. (Eds.) "Plasmid in bacteria" Plenum Press.
- 38.- James, A.A., Morrison, T.P. & Kolodner, R. (1983). Isolation of genetic elements that increase frequencies of plasmid recombinantes. *Nature* 303: 256-259.
- 39.- Hopkins, J.D., Clements, M.B., Liang, Y.T., ISberg, R.R. & Syvanen, M. (1980). Recombination genes on the Escherichia coli sex factor specific for transposables elements. *Proc. Natl. Aca. Sci.* 77(5):2814-2818.
- 40.- Chernin, L.S. & Ovdadis, M.I. (1980). Plasmid control recombination in E. coli K-12. *Molec. Gen. Genet.* 179:399-407.
- 41.- Clerget, M., Chandler, M. & Caro, L. (1981). The structure of R1drd19: A revised physical map of the plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 181: 183-191.

- 42.- Barton, C.R., Warren, R.L., Jerzo, P., Easton, A.M. & Rownd R.H. (1979). SalI restriction endonuclease maps of FII incompatibility grup R plasmid. Plasmid 2:150-154.
- 43.- Tanaka, N., Cramer, J.H. & Rownd, R.H. (1976). EcoRI restriction endonuclease map of composite R plasmid NR1. J. Bacteriol. 127(1):619-636.
- 44.- Perlman, D. & Rownd, R.H. (1975). Transition of R factor in Proteus mirabilis: molecular structure and replication of NR1 deoxyribonucleid acid. J. Bacteriol. 123(1):209-214.
- 45.- Watanabe, H., Mise, K. & Hashimoto, H. (1982). Recombination between two IS1s flanking the r-determinant of R100.1: Involvement of dor and recA gene functions in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 150(1):113-121.
- 46.- Chandler, M., Allet, B., Gallay, E., Boy de laTour, E. & Caro, L. (1977). Involvement of IS1 in the diddociation of the r-determinant and RTF component of the plasmid R100.1. Molec. Gen. Genet. 153: 289-295.
- 47.- Huffman, G.A. & Rownd, R.H. (1984). Transition of deletion mutants of the composite resistance plasmid NR1 in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 159(2):488-498.
- 48.- Peterson, B.C., Hashimoto, H. & Rownd, R.H. (1982). Cointegrate formation between homologous plasmids in Escherichia coli. J. Bacteriol. 151(3): 1086-1094.
- 49.- Horii, I.Z. & Clark, A.J. (1973). Genetic analysis of the RecF pathway to genetic recombination in Escherichia coli K-12: Isolation and characterization of mutants. J. Mol. Biol. 80:327-344.
- 50.- Jenkins, S.T & Bennett, M.P. (1976). Effect of mutations in desxyribonucleic acid repair pathway on the sensitivity of Escherichia coli K-12 strains to nitrofurantoin. J. Bacteriol. 125(3):1214-1216.
- 51.- Miller, J.H. (1972). Experiments in moleculalr genetics. 2da. Ed. Cold Spring Harbor. New York. U.S.A.

- 52.- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York U.S.A.
- 53.- Bellamy, A.R. & Ralph, R.K. (1968). Recovery and purification of nucleic acids by means of Cetyltrimethylammonium-bromide. pag. 156-160. En "Methods in Enzimology" Vol XII.
- 54.- Grustein, M. & Hogness, D.S. (1975). Colony hibridization: a method for isolated a cloned DNA that contain a specific gene. Proc. Natl. Aca. Sci. 72:158-164.
- 55.- Arraj, J.A & Marinus, M.G. (1983). Phenotypic reversal in dam mutants of Escherichia coli K-12 by a recombinant plasmid containing the dam<sup>+</sup> gene. J. Bacteriol. 153(1): 562-565.
- 56.- Blohm, D. & Goebel, W. (1978). Restriction map of the antibiotic resistance plasmid R1drd19 and its-derivates pNK102 (R1drd-19B2) and R1drd-16 for the enzymes BamHI, HindIII, and SalI. Molec. Gen. Genet. 167:119-127.
- 57.- Gómez-Eichelmann, M.C. & Torres, H.K. (1983). Stability of plasmid R1-19 and R100 in hiper-recombinant Escherichia coli strains and Salmonella typhimurium strains. J. Bacteriol. 154(3):1493-1497.
- 58.- Jorgensen, R.A. & Reznikoff, W.S. (1979). Organization of structural and regulatory genes that mediate tetracycline resitance in transposon Tn10. J. Bacteriol. 138:705-714.
- 59.- Uhlin, B.E. & Nordsdtröm, K. (1975). Plasmid incompatibility and control of replication: copy mutants of the R-factor R1 in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 124(2): 641-649.
- 60.- Marinus, M.G. & Morris, R. (1974). Biological function for 6-Methyladenine residues in the DNA of Escherichia coli K-12. J. Mol. Biol. 85: 309-322.