

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Quimica

INTEGRACION DE UN PLASMIDO DE RESISTENCIA
EN EL GENOMA DE E. COLI POR EL FENOMENO
DE SUPRESION INTEGRATIVA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO

P R E S E N T A:

Ma. ELENA ZETINA ROSALES

México, D. F.

1974



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tests
CLASS _____
NO. 1470
SCHA. 11/7/47
PROC. _____

~~358~~

352

359



JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE:	ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ
VOCAL:	VICTORIA VALLES SANCHEZ
SECRETARIO	FRANCISCO BOLIVAR ZAPATA
1er. SUPLENTE:	JAIME MARTUSCELLI QUINTANA
2o. SUPLENTE:	BEATRIZ MEDINA JIMENEZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS.

SUSTENTANTE:

MA. ELENA ZETINA ROSALES.

ASESOR DEL TEMA:

FRANCISCO BOLIVAR ZAPATA

A MI MADRE

INDICE GENERAL .

PROLOGO: motivos del trabajo -----	PAG. 1
INTRODUCCION:-----	6
MATERIALES Y METODOS:-----	35
1) materiales.	
2) métodos.	
RESULTADOS:-----	42
1). Planteamiento teórico-----	42
2). Construcción de una cepa donadora con un factor de resistencia a antibióticos...	46
DISCUSION Y CONCLUSIONES-----	56
BIBLIOGRAFIA-----	61

P R O L O G O

Ingeniería Genética en E. coli, se define como la posibilidad de manipular y seleccionar pequeños fragmentos del genoma bacteriano.

La importancia de la ingeniería genética radica en la posibilidad de introducir en E. coli, la información genética de la misma especie, ó bien, de especies filogenéticamente relacionadas y pensar posteriormente en la posibilidad de transferencia de información genética de eucariotes.

Es importante, entonces, conocer mecanismo de regulación de transcripción de la información genética y de transposición de genes en E. coli.

En cuanto a los mecanismos de regulación de la transcripción, - Zubay (1973) diseñó un sistema de transcripción "in vitro" del operón del triptofano de E. coli, teniendo como molde templado el ADN del fago Ø80 que lleva el operón del triptofano de la bacteria; este fago es transductante y al escindirse del genoma bacteriano puede llevar un locus vecino a su sitio de inserción, en este caso el operón del triptofano.

De esta manera se estudió el mecanismo de regulación de dicho operón.

Por sistemas de transcripción de genes, por otro lado, se ha logrado cambiar el locus de un gene determinado de E. coli. En 1966, Berckwith y Epstein transpusieron el locus del operón de la lactosa que se encuentra en el minuto 10 del genoma de E. coli, a diez

sitios diferentes del mismo mapa. La importancia de este tipo de experimentos radica en la posibilidad de determinar si un gene in activado por la presencia de un gene que se ha transpuesto, es esencial a la célula, ó bien, estudiar el control de expresión de un gene ú operón determinados.

También es importante conocer la posibilidad de aumentar la dosis de genes en el genoma bacteriano, en 1971, en este laboratorio, - (Bolívar, Z.F. en prensa) se construyó una cepa polilisogénica en la cual se insertaron diez profagos Mu-1 en el genoma de E. coli, cada uno de los cuales aumenta 1% del genoma bacteriano. Se han reportado cepas polilisogénicas con profagos de especies distintas como lambda y P2, ó bien, con variantes de un mismo fago. Es posible transferir información genética de diferentes especies a E. coli, por medio de un proceso genético, la transformación, - que se ha definido como el fenómeno por el cual, un ADN donador pa sa a través de un proceso celular complicado, que se establece con la entrada del ADN a la célula y termina con un proceso de recombi nación entre ADN celular y ADN donador, aunque también puede existir transformación sin que sea necesario el proceso de recombi nación, es decir, con ADN episomal, ya que los episomas pueden perma necer en la célula receptora independientemente del cromosoma celu lar.

Se ha logrado la transferencia de material genético en E.coli con ADN de la misma especie y ha sido útil como modelo de estudio de introducción de material genético de especies filogenéticamente re

cionadas, S. typhi y B. subtilis (En este laboratorio, Sánchez, F.), encontrándose una frecuencia de transformación similar con ADN de Salmonella y E. coli.

En 1974, Cohen formó un plásmido híbrido con ADN de un plásmido de S. aureus que confiere resistencia a penicilina y ADN de un plásmido de E. coli que confiere resistencia a varios antibióticos, con este híbrido transformaron a E. coli, obteniendo una cepa con las características de resistencia de los plásmidos padres, un mes después, Cohen reportó un plásmido híbrido formado por fragmentos de ADN de un plásmido de resistencia a tetraciclina y fragmentos de ADN de Xenopus leavis, los cuales fueron obtenidos por una endonucleasa de restricción de E. coli, que rompe ADN en sitios específicos.

Por otro lado, E. coli, es un microorganismo que carece de una función enzimática termoestable, la glucosa isomerasa, la cual cataliza el paso de glucosa a fructosa.

Streptomyces pheaocromógenes tiene actividad termoestable de glucosa isomerasa, que es importante desde el punto de vista industrial, ya que la fructosa tiene propiedades edulcorantes mayores que la glucosa.

Con la referencia de los trabajos de Cohen, se pensó en este laboratorio, construir un plásmido híbrido con un factor de resistencia a antibióticos, R100 de E. coli y ADN de Streptomyces y transferirlo a E. coli para obtener una mutante de E. coli con actividad termoestable de glucosa isomerasa con la ventaja de que este último microorganismo está bien estudiado por un lado y su crecimiento es fácil por otro. (trabajo de Bolívar, F. en preparación).

Es palpable la importancia de este tipo de experimentos dentro del campo de la ingeniería genética, pero también representa desventajas considerables como es el hecho de la posibilidad de transferir oncogénos, ya que se está tratando de introducir segmentos de material genético en células de mamífero.

Berg en 1972, con el objeto de estudiar la biología molecular del virus SV40 y células de mamíferos con las cuales interacciona dicho virus, insertó en el genoma del SV40, información del bacteriófago lambda, que además lleva el operón de galactosa de E.coli. Como se sabe, este virus está compuesto de ADN y puede formar una asociación covalente, estable y hereditaria con los genomas de algunas células de mamíferos. El ADN purificado de este virus, puede transformar células aunque con una eficiencia baja. Es posible que dichas partículas sirvan como vectores para introducir secuencias de genoma no viral a células de mamíferos.

El trabajo presentado aquí puede contribuir al estudio de amplificación de genes. Aunque ya había sido reportado el fenómeno de supresión integrativa con el factor sexual F(57) se pensó en hacer este tipo de experimentos con un factor de resistencia a antibióticos, - el R100, que es el que se piensa utilizar para la formación de plásmidos híbridos. Resultaba interesante presuntarse lo siguiente:

1. Si el factor de resistencia pudiera integrarse en el genoma de E. coli, existiría un sitio específico en el genoma bacteriano para dicho evento?

2.- Al integrarse en genoma bacteriano ¿ Sería este factor capaz de promover transferencia de material genético, es decir, podría actuar como una célula Hfr (alta frecuencia de recombinación?

3.- Además de promover transferencia de material genético ¿Se transferirá el factor R100 a una célula receptora adecuada?

El dar respuesta a estas preguntas constituye el objeto del trabajo presentado aquí.

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

Jacob y Wollman definieron a los plásmidos como elementos genéticos los cuales pueden existir en las células en dos estados:

- a) Integrados al genoma celular, ó bien,
- b) En el citoplasma celular, es decir, independientemente del genoma celular.

Estos elementos pueden ser adquiridos por las células por medio de infección ó por un proceso de conjugación celular. (1).

Se conocen varios tipos de plásmidos bacterianos, entre los cuales pueden citarse:

1) Los factores sexuales F. Se han clasificado a las cepas de E. coli en varios tipos: de acuerdo a su capacidad para formar recombinantes.

a) Las cepas F^+ , forman recombinantes cuando se cruzan con cepas F^+ ó F^- , son fértiles. Se ha demostrado que en estas cepas, existe un ADN específico (1).

b) Las cepas F^- , no son fértiles, no forman recombinantes cuando se cruzan con otras cepas F^- .

La diferencia entre estas cepas está relacionada con un elementogenético independiente, un factor de fertilidad F, ó plásmido F, demostrándose su existencia con un ADN específico presente en las células F^+ , pero no en las células F^- (1,2).

En 1950 se encontró una cepa F^+ , que al ser cruzada con una cepa F^- , formó recombinantes con mayor frecuencia que las clásicas F^+ .

Esta cepa se denominó Hfr (High frequency recombination) (alta frecuencia de recombinación). (3,4) Se sabe que el carácter Hfr, es el último en pasar entre todos los demás caracteres.

También se analizó la transferencia cromosomal de células Hfr a células F^- usando la cepa Hfr de Cavalli (Hfr C) Esta cepa mostró una transferencia de marcadores ordenada, aunque el origen fué diferente del encontrado para la cepa Hfr H (5,6). Estas cepas empezaban la transferencia de ADN en sitios diferentes en el cromosoma bacteriano e iban en direcciones opuestas. (Fig. I)

Usando una cepa Hfr, Jacob y Wollman demostraron en cruces de células Hfr x F^- , que había una transferencia orientada y uniforme del cromosoma bacteriano de una célula Hfr a una célula F^- . (1)

En la figura 2, se muestran los mapas genéticos de varias cepas Hfr H y Hfr C. Hay buenas razones para pensar que en las células Hfr, el factor F de alguna manera está relacionado con el cromosoma y una de ellas es que las cepas Hfr ocasionalmente revierten al estado F^+ .

El factor F, se escinde del cromosoma en una cepa Hfr y aparecen en el citoplasma como una cepa F^+ . (1)

Este hecho demostró que las cepas Hfr no habían perdido el factor F. Se sabe que el carácter F^+ es alta y rápidamente infeccioso en una mezcla de cultivos, las cepas Hfr no convierten F^- a F^+ , y que muchas de las recombinantes de las cruces Hfr x F^- son F^- y las pocas que reciben el determinante de fertilidad son Hfr (6).

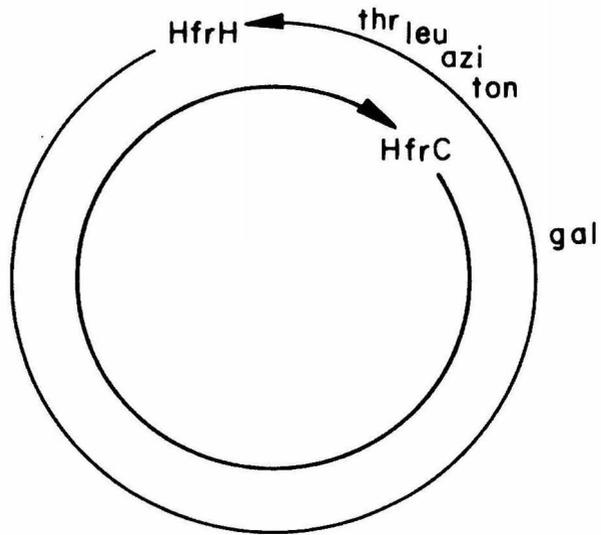
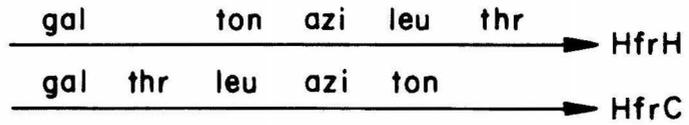


FIG.1 REPRESENTACION DEL ORDEN DE TRANSFERENCIA DE GENES DE CEPAS HfrH y HfrC.

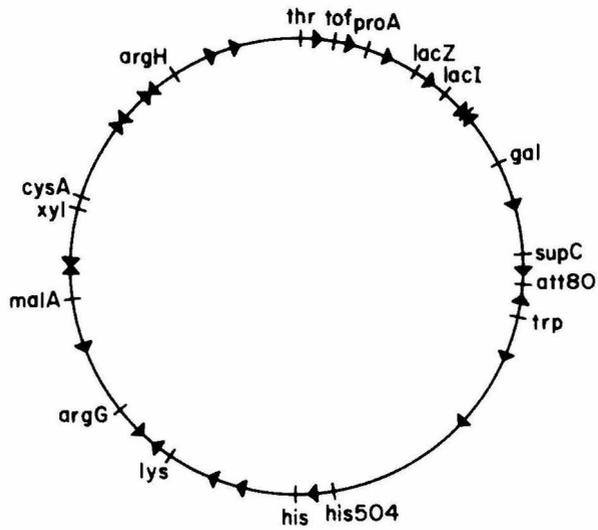


FIG. 2 MAPA GENETICO DE *E. coli* K-12 MOSTRANDO SITIOS CROMOSOMALES DE INSERCIÓN DE F Y - DIRECCIÓN DE TRANSFERENCIA DE CEPAS Hfr.

Entonces el factor F puede replicarse en dos estados:

En el estado autónomo, F es altamente infeccioso, es curable por acridina que es un colorante que se piensa que inhibe selectivamente algunos plásmidos y otros agentes. La frecuencia de transferencia de los genes cromosomales a otras células es baja en células F^+ . (7)

En el estado integrado el factor F no es infeccioso, es incurable por acridina y otros agentes, pero promueve, la transferencia del cromosoma bacteriano entero a una frecuencia alta (8).

Otra de las características de las cepas Hfr, es que no permiten una multiplicación autónoma de un factor F libre en la misma célula, por razones no entendibles.

Podría hacerse una comparación entre los plásmidos y algunos bacteriófagos que también pueden existir en un estado autónomo o bien, integrados al genoma celular.

En caso de los fagos, la replicación autónoma es mucho más rápida que la replicación del profago (el ADN del bacteriofago integrado al genoma celular) y culmina en una destrucción celular.

En cambio la replicación de F continúa indefinidamente, la velocidad de crecimiento puede ser la misma que la de la célula en la cuál crece. La replicación autónoma del factor es potencialmente más rápida que el crecimiento celular, esto puede verse en un cultivo donde las células F^+ infectan a las células F^- en una fase logarítmica de crecimiento. La fracción de las células F^+ aumenta continuamente mostrando que F se está multiplicando más rápidamente que la célula.

Si se considera, por ejemplo, una célula que contiene una partícula F, durante un ciclo de división, ésta transfiere un factor F a otra célula, se divide y produce dos células hijas F^+ . El número total de partículas F ha aumentado por un factor de tres durante un tiempo, cuando el número de células sólo fué doblado.

La presencia del factor F es reconocida por dos efectos principales:

- 1.- La célula actúa como un donador genético.
- 2.- Produce un filamento especial, el cuál no está relacionado con motilidad.

Estos filamentos han sido clasificados como miembros nuevos de apéndices heterogéneos conocidos como fimbrias ó "pili". (9,10,11).

Se conocen varios tipos de "pili" entre los cuáles se encuentran:

- 1.- Los pilis comunes que no están directamente relacionados con la transferencia de genes, aunque pueden jugar un papel no específico para estabilizar los pares de células conjugantes. (12,13).
- 2.- La pilis sexuales son codificados por el factor F y otros factores sexuales, son aparentemente la estructura por la que pasa el material genético del donador al receptor. (14)

El pili F es detectable en células F^+ ó Hfr por la aparición de un antígeno nuevo y porque dicho pili es el receptor de ciertos fagos que lisan exclusivamente cultivos que tienen el factor F. (15)

Los fagos específicos de F son de dos clases:

- 1.- Fagos isométricos que llevan RNA y se pegan a un lado del pili.
- 2.- Fagos filamentosos que tienen ADN de una cadena y se unen al

extremo del pili.

Se han detectado cambios en las células que codifican pilis F: La bacteria F^+ precipita más rápidamente que la F^- cuando el pH del medio se baja, tienen una carga de superficie alterada.

Las células F^+ viajan más rápidamente que las F^- a través de medios semisólidos.

El pili F está formado por una proteína denominada pilina y es esencial para la conjugación. La bacteria no actúa como donador genético si no se produce pili F, si se quita éste ó si sus extremidades están bloqueadas con un fago, (16) Ya que por esta estructura pasa la información genética en una cruce de bacterias.

Cruzando células F^+ y F^- , la frecuencia de recombinación para cualquier región cromosomal es de 10^{-4} a 10^{-5} de la población de células F^+ , aunque la conjugación ocurre a frecuencias más elevadas. (17)

La frecuencia de conjugación puede ser estimada de la relación de la transferencia del factor F, que es medida por la aparición en la célula receptora de la capacidad de donador y de la sensibilidad a fagos específicos de F.

También puede medirse la frecuencia de conjugación por la transferencia de un marcador que forma parte de un factor compuesto como F' , ó de algún marcador cromosomal.

Estos métodos sugieren que la eficiencia de conjugación es alrededor de 100%, lo que va de acuerdo con la proporción alta de las bacterias que muestran pili F cuando se observan al microscopio electrónico y que son susceptibles al fago específico F. (18, 19). Por otro lado el hecho de que los cultivos F^+ , y Hfr sean agluti-

nados por antisuero específico del factor F, también demuestra que una gran proporción de bacterias produce dicho antígeno específico.

(20)

Factores de resistencia a antibióticos. (Factores R).-

Desde 1954 se aislaron cepas de enterobacterias resistentes a drogas como cloramfenicol, tetraciclina, estreptomycin y sulfonamidas. (22)

En 1959 se encontró que la resistencia a drogas era transferible entre Sh. dysenteriae y E. coli, cuando se mezclaban cultivos de estas cepas, (21, 22) pero no se conocía el mecanismo de transmisión. Se encontró que la resistencia a drogas era múltiple y que además esta transferencia no estaba mediada por bacteriófagos ó por agentes filtrables.

Esta resistencia a drogas era transmitida independientemente de la presencia ó ausencia del factor F y sin relación a la polaridad -- del mismo, (23) y que esta propiedad se perdía espontánea e irreversiblemente cuando las células se almacenaban. (23)

En un principio se encontró que se eliminaban a una frecuencia relativamente alta tratando las células con acridina, sin embargo esta resistencia no siempre era susceptible a acridina (24,25).

El rango de transmisión de resistencia a drogas incluye todas las especies de Enterobacteriaceas, Vibrio comma, P. pestis y S. aureus. Se dió el nombre de factor R (Resistencia drogas) a la propiedad de transmisión de resistencia a drogas (26).

Cuando se observó por primera vez que la resistencia a drogas era transmisible, se hizo una analogía con el factor F, se demostró la conjugación entre células en donde el factor R pasa del donador al receptor, aunque ésto ocurre a una frecuencia menor que con el fac-

tor F. Se demostró que el factor de resistencia R era distinto del factor F, ya que los cultivos que llevaban el factor R, no resultaban aglutinados por antisuero específico de F y no eran lisados por fagos específicos de F.

Watanabe demostró que la mayoría de los factores R inhibían el factor F, y que la introducción de un factor R en una cepa F^+ , reducían la capacidad para conjugarse y al mismo tiempo, abolía la aglutinación por suero específico de F.

Esta capacidad para inhibir el factor F se llama Rfi^+ (inhibición de la fertilidad), (27). Egawa e Hirota atribuyeron esta característica a un represor citoplasmático producido por el factor R, el cuál actuaba sobre el factor F.

Meynell y Datta pensaron que ésto podría reflejar una relación, entre F y Rfi^+ . Sus observaciones fueron las que se esperarían si el factor fi^+ estuviera bajo el control de un represor determinado por un gen regulador en el factor R, el cuál también actuaba sobre F. (23)

La capacidad de un factor Rfi^+ para reprimir F, podría significar ser simplemente reflejo de su capacidad para reprimir su propio factor sexual.

La idea de que el represor fuera producido por factores R, estaba apoyada por la aparición de cultivos de frecuencia alta de transferencia con cepas R^+ . La capacidad de donador fué aumentada también exponiendo una cepa R^+ a radiación UV., probablemente inactivando el represor, como en una inducción con radiación UV en el crecimiento de un fago vegetativo en una bacteria lisogénica. (28)

La relación entre los factores F y Rfi⁺, se estudió observando si las células Rfi⁺ resultaban sensibles a los fagos específicos de F. Si los factores estuvieran relacionados, podrían hacer pilis semejantes y las células llevando Rfi⁺, serían susceptibles al fago de F. La especificidad de estos fagos tiene lugar en la absorción, no en el estado de crecimiento del fago, de tal manera que protoplastos de cepas F⁻ de E. coli K-12, tanto como de Salmonella typhi, Shigella dysenteriae y Proteus pueden ser infectas con ARN de fago específico de F2 o de ARN. Si el pili F fuera producido en unas cuantas células de un cultivo R⁺ F⁻, habría una multiplicación del fago específico de F y sería observada, y si la producción del pili estuviera relacionada con la expresión de la función de conjugación, la proporción de bacterias R⁺ sensibles a fago específico de F aumentaría en cultivos HFT (frecuencia alta de transferencia) en forma paralela con la proporción de bacterias que conjugan y transfieren resistencia a drogas, y si los pilis determinados por F y R fueran idénticos, el hecho de que sean raramente expresados en cultivos R⁺, podría ser suficiente para explicar la ausencia de lisis visible con fagos específicos de F. Probando los factores Rfi⁺, se encontraron cultivos conteniendo una proporción pequeña de bacterias sensibles al fago específico de F, MS2 y la proporción aumentó en preparaciones de frecuencia alta de transferencia. (29,30).

Al microscopio electrónico se observó que estos factores Rfi⁺ codifican un pili sexual semejante al pili F y que la frecuencia de bacterias piliadas en cultivos diferentes de frecuencia alta de transferencia, está relacionada con la frecuencia de transferencia

de resistencia y con células sensibles al fago MS2. (31), además se probaron varios factores R "silvestres" y sólo los factores R_{fi}^+ confirieron sensibilidad a fagos específicos F. (30,32) Entonces F y R_{fi}^+ forman pilis similares.

La relación funcional de factores R y F, como se definió originalmente para el carácter fi^+ , indica que los genes que producen $pili$, en ambos factores, están sujetos al mecanismo regulatorio del factor R.

Mutantes desreprimidas del factor R. - Si la regulación de la formación del $pili$ y la capacidad de conjugación son debidas a un represor, un factor R mutante no podría producir represor y podría conjugarse a una frecuencia alta.

Esta mutante daría lugar a cultivos de bacterias $piliadas$, capaces de conjugarse y sensibles a fago específico de F, ó sea produciría cultivos como los de las bacterias F, pero esta mutante del factor R no suprime la función de F.

Egawa e Hirota transfirieron un factor R_{fi}^+ mutado, R100, a una cepa Hfr y aislaron clonas de bacterias que produjeron recombinantes genéticos a la frecuencia normal de la cepa Hfr. Esta cepa lleva un factor R mutado pero no suprime la fertilidad de la bacteria Hfr y no se reprime más a sí misma. (34)

Una bacteria $R100^+ F^-$, conjuga a una frecuencia mayor que la bacteria que lleva el factor R100 "silvestre" y produce $pili$ semejante al $pili$ F.

En la mutante R100, el represor citoplasmático producido por el gene regulador i , suprime sus propios genes que codifican para el

pili R así como los genes que codifican para el pili F, entonces la mutante R100 es una mutante constitutiva i^- , que no sintetiza represor y es diferente de la mutante constitutiva O^C (del operador) que no sensible al represor. (33)

Meynell y Datta aislaron otras mutantes desreprimidas de otro factor R, el factor R1 por frecuencia alta de resistencia a drogas. Los cultivos $R^+ F^-$ con la mutante R1 fueron lisados por el fago específico de F, MS2. (35)

La desrepresión puede entonces deberse entonces a:

- 1.- La ausencia del represor por mutación en el gene regulador i , ó bien,
- 2.- a la insensibilidad a la represión por una mutación en el operador O^C .

Para distinguir entre estas posibilidades se probó el efecto del factor R mutado sobre un factor F y sobre un segundo factor R "silvestre" (no mutante).

Se concluyó que el factor R100 es una mutante constitutiva del regulador, no reprime a F, no tiene represor y que la mutante R1 es similar pero es susceptible al represor producido por un segundo factor Rfi^+ introducido en la misma célula, también es resultado del gene regulador i .

FACTORES Rfi^- .

Los factores Rfi^- no suprimen la función de F y no codifican para la producción de un pili semejante al pili F.

La carencia de efecto sobre F, podría significar que estos factores no hacen represor (como las mutantes i^- de un factor fi^+) ó que hacen un represor que inhibe su propia función, la cuál no -- tiene efecto sobre F.

Si el primer punto fuera el caso, la eficiencia de transmisión de los factores fi^- sería siempre alta pero no podría aumentarse cuando el factor ha entrado a un huésped nuevo.

Sin embargo, en general, los factores Rfi^- son transferidos a una frecuencia no más alta que los factores Rfi^+ y los sistemas de -- frecuencia alta de transferencia pueden ser producidos en una proporción tan alta con factores Rfi^- así como con factores fi^+ .

Por otro lado, la capacidad de conjugación podría también estar limitada por la función defectiva, como se observó con mutantes - defectivas de F. (36,37)

Los factores Rfi^+ reprimen F y aunque la represión también se presenta con muchos factores fi^- , actualmente no hay nada que pruebe que los factores fi^- , los cuales conjugan a frecuencia baja, no sean defectivos.

Los factores Rfi^- , pueden dar lugar a mutantes desreprimidas análogas a las mutantes desreprimidas de los factores Rfi^+ . Se han seleccionado clonas de bacterias R^+ , las cuales transfirieron resistencia a drogas a una frecuencia aumentada. (38) Con estas - mutantes, cerca del 100% de las bacterias transmitieron su resistencia a drogas en 10 minutos, pero los cultivos fueron insens-

bles a fago específico F.

El pili sexual en estas bacterias es morfológicamente distinto del pili F, pero se parece a otro tipo de pili denominado pili I (35).

RELACION ENTRE DNA CROMOSOMAL Y EPISOMAL.

Para el estudio de los plásmidos bacterianos, es necesario conocer la relación entre el ADN cromosomal y ADN de plásmidos, ya sea asociados, ó bien, como elementos independientes en el citoplasma celular.

En cuanto a la inserción de un factor sexual al cromosoma bacteriano, es conveniente hablar del modelo de inserción propuesto por Campbell para fagos temperado como λ

Campbell propuso que, inmediatamente después de que la molécula de ADN fágico entra en la célula, se circulariza. Este círculo se aparea con el cromosoma en la región donde se insertará posteriormente. Se produce un entrecruzamiento dando lugar a la inserción del genoma del fago en el cromosoma bacteriano.

Se regresa a la secuencia vegetativa por el proceso de inversión ó escisión.

Existen varias evidencias que soportan este modelo de integración, entre ellas las más importantes son las siguientes:

- 1.- En el caso del profago λ , se ha podido conocer la secuencia de los genes que integran su cromosoma (Fig.3) se sabe que la secuencia de marcadores en el fago integrado, es diferente a la del fago vegetativo. (es decir, sin integrarse). (41)
- 2.- El profago $\phi 80$, semejante a λ , se inserta cerca del operón del triptofano en E. coli y puede ser mapeado con respecto a los genes trp, gracias a un tipo de mapeo por deleciones.

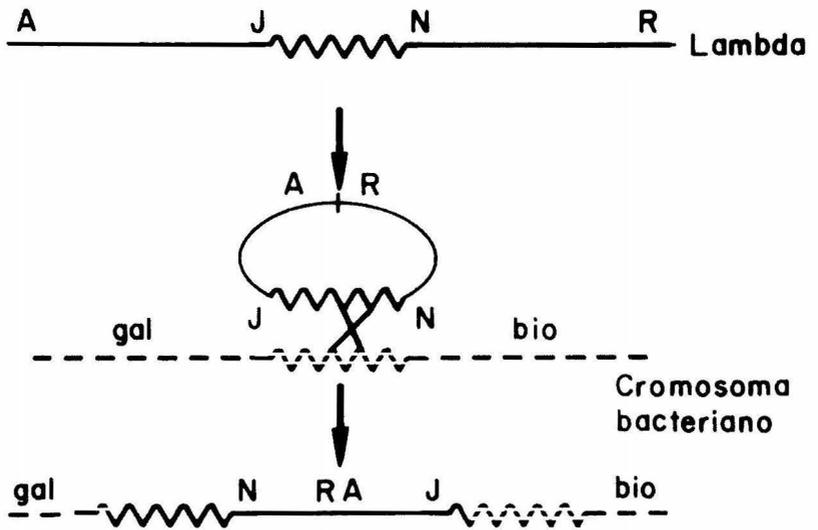


FIG. 3 INTEGRACION DEL FAGO LAMBDA EN EL CROMOSOMA BACTERIANO.

Nuevamente el mapa del profago está de acuerdo a la hipótesis de Campbell. (42)

3.- La integración del profago, parece deberse a la acción de enzimas específicas codificadas por el fago, cuya producción ocurre únicamente en bacterias inmunes. Se han aislado mutantes de este tipo. (44)

4.- Al microscopio electrónico, el cromosoma del bacteriofago λ es un círculo, (46) antes de integrarse y después de la inducción.

5.- Evidencias físicas de la integración lineal del bacteriofago μ en bacterias lisogénicas. (47)

La diferencia entre un agente de transferencia F y un fago temperado como λ , es que éste sintetiza una cubierta proteica que contiene su ADN.

El factor F, sintetiza sólo un pili y una estructura que complementa su expulsión a través de la membrana, de tal manera que -- convierte a la célula en un donador genético transfiriendo ADN - de F a otra célula.

La producción de un fago, como lambda, es letal a la célula, en el caso del factor F, la célula no muere, continúa multiplicándose indefinidamente con el factor. (48)

Hay entonces semejanza entre un fago temperado como lambda y un - factor sexual como F y el modelo de inserción de Campbell puede - ayudar a entender algo de la inserción de plásmidos en el cromosoma celular.

Una de las ideas básicas del concepto de episomas, es que éstos se insertan al cromosoma en lugar de reemplazar una porción de és te. El modelo de Campbell involucra esta idea, dos estructuras -

entrecruzadas pero ninguna de las dos es perdida en el proceso. La idea de que F, como el fago lambda, realmente esté insertado en el cromosoma, deriva de estudios en genes del factor F'.

Dicho factor es un factor F que al escindirse del cromosoma bacteriano puede llevar algunos genes vecinos al sitio donde estaba insertado, el episoma F se parece al fago lambda en el tipo de mutantes que llevan genes del cromosoma bacteriano.

Como en el caso del fago lambda, estas mutantes son producidas sólo de factores F integrados (Algunas Hfr) y comprenden bloques contínuos de genes contíguos al sitio de unión de F de la cepa Hfr en cuestión, su presencia es detectada por su capacidad de transferir a una frecuencia alta, aquellos genes bacterianos asociados con F, como el factor F puede multiplicarse indefinidamente en la clona bacteriana de origen (sin matar a la célula) como lo hace el fago lambda, es posible examinar si la formación del factor F, esta asociada con una deleción de material genético del cromosoma bacteriano. Al menos, para algunos factores F', ésto es así, el evento puede no ser exactamente recíproco.

La integración del factor F, algunas veces produce deleciones ó rompimiento de los genes vecinos al sitio de inserción y probablemente ésto sea provocado por los cuantos de escisión.

El factor F, puede insertarse por un simple entrecruzamiento con el cromosoma y ésto relaciona secuencias de bases similares, pero existen además otros mecanismos que pueden tener más en común con la escisión anormal (F'lac) que con la escisión normal. (en el caso del fago lambda).

REPLICACION DEL ADN.

En los estudios de replicación del cromosoma de E. coli, es importante determinar si cada ciclo de replicación se inicia en un sitio fijo del cromosoma bacteriano.

La hipótesis del replicón implica que un elemento genético independiente en una célula, se replica en un punto de iniciación fijo, en el cual la replicación puede ser iniciada y debe establecer su propio sistema de regulación operativa en este punto especial.

Los plásmidos son potencialmente independientes y tienen su propio sistema de replicación, incluyendo un punto de iniciación. La inserción de un plásmido da lugar a un cromosoma con dos sitios teóricos de iniciación.

Nagata en 1963, reportó que en cromosomas Hfr, el sitio de inserción de F, actúa como origen de la replicación cromosomal, y procede en dirección opuesta a la secuencia de transferencia durante la conjugación.

Por otro lado, Berg y Caro estudiaron la función del factor sexual F integrado en la replicación del cromosoma. (49). La integración en el cromosoma de un factor F, no tiene efecto detectable sobre el origen y dirección de la replicación del cromosoma. (49)

Existen varios datos sobre la replicación del cromosoma de E. coli, éste es circular. Durante la replicación, la porción duplicada tiene lugar entre dos "horquetas", una de ellas es un punto de crecimiento, la otra es probablemente fija y es el origen de la replicación. (50)

Se postuló que el origen de la replicación del cromosoma es un si tio genético definitivo llamado "replicador", (51)

Nagata en 1963, Nishi y Hosinchi en 1966 han sugerido que el origen es variable en cepas F^- y fija en cepas Hfr, en las cuáles é sta identificado con el sitio de integración del factor F. (52,53, 54).

Caro y Berg en 1968 demostraron que el sitio de integración del plásmido no es el origen de la replicación, estos experimentos in dican que las cepas Hfr estudiadas tienen un sentido de la replicación en dirección de las manecillas del reloj, localizando su o rigen entre las seis y las nueve en el mapa circular y otras cepas mostraron un origen de replicación entre los marcadores gal y trp en sentido contrario. (55) en el mapa de E. coli (Fig. 4)

Oishi, Yoshikawa y Sueoka (1964) demostraron que las esporas de B. subtilis crecidas en un medio rico inician un nuevo ciclo de replicación antes de que finalice el precedente y propusieron é ste como un mecanismo normal de la replicación en las células creciendo rápidamente.

Bird y Lark (1968) demostraron la existencia de la replicación de "horquetas" múltiples en células de E. coli T^- (requieren timina para crecer), creciendo en un medio rico.

Hay evidencias de que a velocidades bajas de crecimiento, sólo hay un punto de crecimiento del cromosoma. (Lark, 1966)

Caro y Berg (1969), definieron un origen de replicación localizado entre los marcadores arg G y xil y una dirección de replicación en el sentido de las manecillas del reloj, (56) creciendo cultivos a velocidades diferentes en varios medios, haciendo lisados con el

fago P1 y analizando la distribución de frecuencia de marcadores. Por ayuno de aminoácidos definieron el origen de la replicación y por la incorporación de BU mostraron la distribución de puntos crecientes sobre los cromosomas.

Por otro lado, se estudió la existencia de la replicación con varios puntos crecientes en E. coli, creciéndola en un medio rico y se concluyó por autoradiografía a diferentes tiempos de duplicación que el ADN es replicado por un proceso simétrico y que la iniciación prematura tiene lugar en los dos cromosomas hijos a la vez. (57)

La interpretación sobre el origen de la replicación y sus direcciones en general coinciden, la replicación es iniciada en el cuadrante izquierdo del mapa genético (Taylor 1970) (Fig 4) y procede en el sentido de las manecillas del reloj.

En 1968, Caro y Berg por un lado y Yahara y Broda por otro, habían concluido que la replicación del ADN era bidireccional, pero atribuida a un origen diferente.

Finalmente en 1972 se definió conclusivamente el origen y dirección de la replicación por dos métodos. (58)

- 1.- Por un gradiente de frecuencia de marcadores en cultivos exponenciales y
- 2.- Por la secuencia de la replicación de los marcadores en cultivos sincronizados.

La medida de dosis de gen es decir la cantidad de ADN de profago en las cepas lisogénicas para un fago ó la determinación de la secuencia de la replicación se llevó a cabo por una hibridización ADN-ADN.

FENOMENO DE SUPRESION INTEGRATIVA.

El término *dnaA*, se refiere a una mutación en el genoma de E.coli, que confiere sensibilidad a la temperatura para la replicación del ADN (59).

Una cepa bacteriana con dicha mutación crece a 30°C pero no a 42°C. A una temperatura más alta de 30°C, la replicación del ADN disminuye gradualmente. Sin embargo en esta mutante, los fagos T6 y lambda, se replican a 42°C, lo que indica que la replicación del ADN no es eliminada a una temperatura elevada.

Se ha demostrado con el uso de isótopos radiactivos y por el uso de gradientes de cloruro de cesio, que durante los ciclos de elevación de la temperatura, la replicación se detiene a 42°C en una región específica del cromosoma; esta evidencia y otras indican que la mutación afecta un paso en la iniciación de la replicación del cromosoma. (60)

Para demostrar ésto se usó una cepa con una mutación sensible a la temperatura, la mutación ha sido mapeada por conjugación y transducción entre los marcadores *ilv* y *mtl*, aproximadamente a los 73 minutos del mapa de E. coli de Taylor (1967). (Fig 4)

No se sabe que esta mutación afecte las funciones "in vitro" de enzimas involucradas en síntesis de ADN (Buttin y Kohiyama), pero si se ha encontrado una diferencia en la composición de la membrana de la célula mutante. (61)

Una mutación sensible a la temperatura, afectando la iniciación de

de la replicación del ADN, en E. coli, no está complementada por un factor F. Sin embargo, si se aislan revertantes resistentes a la temperatura de una cepa F⁺ temperatura sensible, se obtienen células con el factor F integrado en varios sitios, es decir, como células Hfr.

Estas células resistentes a la temperatura, todavía llevan la mutación sensible a la temperatura y sin embargo replican su ADN. Además estas células son sensibles a anaranjado de acridina y bromuro de etidio a 42°C, no así a 30°C, esto sugiere que a la temperatura restrictiva están bajo el control del replicón de F. Lo mismo sucede con F'lac, se obtiene un gran número de cepas Hfr resistentes a la temperatura. (59)

El factor F'lac se integra en la región lac del cromosoma de E. coli, pero también en células con una deleción en la región lac, se obtuvieron cepas resistentes a la temperatura donde la integración del factor F'lac está en otros sitios y no en la región lac del genoma de E. coli.

Otra mutación sensible a la temperatura, afectando la iniciación de la replicación del ADN requiere la función especificada por el gen rec A.

La supresión integrativa sólo tiene lugar para mutaciones que afecten la iniciación de la replicación del ADN, la integración del factor F sólo, no es suficiente para la supresión integrativa, se requiere otro paso cuya naturaleza es desconocida. (59)

Se concluyó entonces que en las cepas resistentes a la temperatura la replicación del cromosoma y la división celular están bajo el control del factor F, se sabe que en estas células el cromosoma es parte del replicón de F.

Por otro lado y al tiempo en que llevabamos a cabo este trabajo en el laboratorio se reportó el aislamiento de revertantes resistentes a la temperatura de cepas de E. coli, llevando una mutación dnaA - sensibles a la temperatura (iniciación de la replicación del cromosoma) de un factor reprimido ϕ de uno desreprimido R, del tipo como F, ϕ bien un factor Col. V2. Muchas de las revertantes resultaron con propiedades de cepas Hfr con una variedad de direcciones y orígenes de transferencia.

En algunas revertantes se obtuvieron episomas llevando el factor R y parte de la región lac. R' lac y podían ser aislada por transducción.

Se ha postulado que en estas cepas suprimidas, la iniciación de la replicación se lleva a cabo en el sitio de iniciación del episoma, el cromosoma entero es ahora parte del replicon del episoma y que en algunos sistemas, la velocidad de supresión integrativa es mucho más alta que la reversión de la mutación dnaA para el factor R y otros factores como Col. (62)

Se construyeron una serie de cepas que llevan dos marcadores iguales: uno, en una posición fija sobre el cromosoma, el profago lambda, el otro en posición variable, el profago Mu.

El fago Mu se integra en muchos sitios del cromosoma de E.coli y a menudo, dentro de un gen, inactivándolo. Esto lleva a una localización precisa del sitio de integración.

Ambos métodos indican que el origen de la replicación está localizado en la región ilv (74'min.) y que la replicación procede simultánea y simétricamente en ambas direcciones opuestas a un final localizado cerca del marcador trip (27 min.), en un punto diamétricamente opuesto al del origen. (Fig. 4)

En estos experimentos, el origen de la replicación se definió primero por el máximo en el gradiente de las curvas de frecuencias de marcadores.

Los datos sobre secuencia de replicación en células sincronizadas por ayuno de aminoácidos confirman el origen.

La bidireccional de la replicación de muestra por curvas del gradiente de frecuencia de marcadores y por la secuencia de replicación en cultivos sincronizados.

La secuencia de replicación de marcadores en cultivos sincronizados es claramente en sentido contrario de las manecillas del reloj para ilv, mal A, tyr A, his y trip; y en sentido de las manecillas del reloj, para los marcadores de la otra mitad del mapa. Este experimento indica también que la replicación debe proceder simultáneamente en ambas direcciones y prosiguen a la misma velocidad. (58)



Fig. 4 Mapa genético de E. Coli

CURACION DE PLASMIDOS EN E. COLI POR RIFAMPICINA Y NARANJA DE ACRIDINA

Un plásmido de acuerdo con Jacob y Wollman (63), es un elemento genético que puede agregarse al genoma de la célula y que puede existir en dos estados: el estado autónomo y el estado integrado.

En el estado autónomo el factor F por ejemplo, es un cromosoma no esencial a la célula, pero que se replica sincrónicamente con el cromosoma celular. (48)

En el estado integrado, el factor F es replicado pasivamente por el cromosoma celular.

En el estado integrado, el factor F es replicado pasivamente por el cromosoma celular.

En el estado autónomo, la replicación del factor F es inhibido por concentraciones de anaranjado de acridina que no afectan la replicación del cromosoma, en el estado integrado F es insensible a la misma concentración de anaranjado de acridina. (64)

Ciertas dosis de un antibiótico de la familia de la rifamicina inhibe selectivamente la síntesis de ADN extracromosomal que codifica para el ARN ribosomal en oocitos de *Xenopus laevis*, sin afectar la replicación cromosomal. (65)

Dosis bajas de una rifamicina, rifampicina, inhibe específicamente la ARN polimerasa, cura células F^+ del mismo episoma. (66)

Existe una mutante de E. coli cuya ARN polimerasa es resistente a rifampicina, no se cura del episoma.

Las mutantes con la ARN polimerasa alterada que son resistentes a la rifampicina no se curan, por lo que se piensa que la interacción de la droga con la subunidad beta de la ARN polimerasa.

La ARN polimerasa podría desnaturalizar alguna región del ARN del plásmido, para que la replicación ocurriera, por ejemplo, el rompimiento de la estructura helicoidal podría ser necesaria para la iniciación, alternativamente, la subunidad beta de la ARN polimerasa podría ser rota por la ARN polimerasa misma y otra enzima hipotética responsable de la replicación del plásmido

También es posible que una molécula de ARN transcrita del cromosoma ó del episoma sea requerida para la replicación del episoma. Riya y colaboradores han observado que la expresión de algunos genes episomales es preferencialmente inhibida por rifampicina (67)

Por otro lado, la cadena de ARN transcrita del plásmido podría servir en otra función además de mensajero para la síntesis de proteínas, en particular, el ARN podría ser usado como un templado para síntesis de ADN dependiente de ARN ó podría actuar como un templado para la extensión covalente por una ADN polimerasa.

Kornberg ha observado que la rifampicina inhibe la conversión del ADN de una cadena padre del fago M13 a la forma replicativa de doble cadena, tanto como la multiplicación de la forma replicativa. (68)

MATERIALES Y METODOS

1.-

Tabla 1.- Cepas Bacterianas.

cepa	sexo	características genéticas	uso	derivación	fuentes
JM90	F ⁻	thr ⁻ leu ⁻ ara ⁻ proA ⁻ lac ⁻ pyrE ⁻ gal ⁻ his ⁻ xil ⁻ mtl ⁻ argG ⁻ B ₁ ⁻ sm ^r	receptora la. transd.	AB2538	A. Taylor
JM346	F ⁺	thr ⁻ leu ⁻ lac ⁻ mal ⁻ dnaA thy ⁻ ilv ⁻ B ₁ ⁻	donadora la.	CSH 42	CSH
JM275	F ⁻	thr ⁻ leu ⁻ ara ⁻ pro ⁻ pyrE ⁺ gal ⁻ his ⁻ xil ⁻ mtl ⁻ argG ⁻ dnaA B ₁ ⁻ sm ^r	la. receptora conjug.	JM90 infec. con P1 vir	este lab.
JM1	Hfr	prototrofa	donadora la. conjug.	AB 284	A.Taylor
JM276	F ⁻	thr ⁻ leu ⁺ pro ⁻ pyrE ⁺ his ⁻ argG ⁻ ara ⁻ lac ⁻ gal ⁻ xil ⁻ mtl ⁻ dnaA B ₁ ⁻	receptora 2a. conjug.	JM275XJM1	este lab.
JM104	Rfi ⁺	thr ⁻ leu ⁻ lac ⁻ TG ^S R (sm sul tc cm). fi ⁺	donadora 2a. conjug.	WA	Watanabe

cepa	sexo	características genéticas	uso.	derivación	fuelle
JM277	Rfi ⁺	thr ⁻ leu ⁺ pro ⁻ pyrE ⁺ his ⁻ argG ⁻ ara ⁻ lac ⁻ gal ⁻ xil ⁻ dnaA Rfi ⁺	integración factor Rfi	JM276XJM104	este lab.
JM327	F'	Δ (lac pro) ΔmZ del F'lac ⁺ B ₁ ⁻ Sup E.	donadora 3a. conjug.		
JM279	F.	thr ⁻ leu ⁺ proA ⁻ argG ⁻ pyrE ⁺ lac ⁻ gal ⁻ xil ⁻ mtl ⁻ sm ^r - dnaA B ₁ ⁻ F'lac	control cura- ción	derivación JM327XJM276	fuelle este lab.
JM281	F'	thr ⁻ leu ⁻ pyrE ⁻ proA ⁻ his ⁻ argG ⁻ lac ⁻ gal ⁻ gal ⁻ xil ⁻ mtl ⁻ Rfi ⁺ B ₁ ⁻	control cura- ción	JM327XJM90	este lab.
JM284	Hfr	thr ⁻ leu ⁺ proA ⁻ his ⁻ argG ⁻ pyrE ⁺ lac ⁻ gal ⁻ xil ⁻ mtl ⁻ sm ^r B ₁ ⁻ dnaA Rfi ⁺	2a. transd.	JM277 a 42 C supresión in- tegrativa	este lab.

Características verificadas antes de cada experimento.

Nomenclatura de acuerdo a Taylor, A. (69)

Nomenclatura.-

thr.- treonina.

leu.- leucina.

pyr A.- pirimidina A.

pro.- prolina.

his.- histidina.

arg.- arginina.

thy.- timina.

lac.- utilización de lactosa.

gal.- utilización de galactosa.

ara.- utilización de arabinosa.

xil.- utilización de xilosa.

mtl.- utilización de manitol.

sml- resistencia a estreptomicina.

Rfi⁺.- factor de resistencia a drogas. inhibición de fertilidad.

Hfr.- alta frecuencia de recombinación.

F⁺.- factor de fertilidad.

F⁻.- factor de fertilidad negativo.

2.- Cepas de bacteriofagos.-

Pl vir.- fago transductante mutado (lítico). No es capaz de producir represor.

Se propagó sobre la cepa JM1 obteniéndose lisis confluyente con un título de 5.8×10^9 fagos/ml.

3.- Medios de cultivo.

Medio completo.- usado para crecimiento de bacterias. (Luria)

Bactotripton-10 g.

Extracto levadura-5 g.

Cloruro de sodio- 10 g.

timina- 30 mg.

agua deionizada-1000 ml.

Ajustar a pH= 7 con NaOH

Los reactivos son de la casa Difco.

Medio mínimo de cultivo.

Na₂HPO₄ -6 g.

KH₂PO₄ -3 g.

(NH₄)₂SO₄ -2 g.

MgSO₄ (sol.0.001M) -1 ml.

FeSO₄ 2X10⁶ M -1 ml.

Ca (NO₃) 2 1% -1 ml.

Glucosa 20% -10 ml.

Agua deionizada -1000 ml.

Los reactivos son de la casa Baker.

Añadir los requerimientos necesarios para cada cepa.

4.- Rifampina -10 ug/ml. (Laboratorios Le petit)

naranja de acridina-25 µg/ml. (British Drug Houses. Ltd.England)

METODOS

1.- Propagación del fago P1 vir.

- a) crecer la cepa donadora a una concentración de 5×10^9 cel/ml.
- b) diluir el stock del fago a 5×10^6 fagos/ml. en medio completo.
- c) fundir 4 ó 5 tubos de agar 0.5 % de medio completo y a cada tubo, agregar 0.04 ml. de Ca. c12 0.25M.
- d) trabajando con un tubo cada vez, agregar 0.1 ml. del cultivo de la cepa donadora y 0.1 ml. de la dilución del fago.
- e) sembrar sobre cuatro ó cinco cajas de medio completo de agar 1%.
- f) incubar las cajas durante cinco horas a 37C.
- g) agregar, después de este tiempo, 2.5 ml. de medio completo e incubar dos horas más.
- h) tomar el líquido que aparece en la superficie de las cajas y centrifugar en tubos que contienen 0.5 ml. de cloroformo.
- i) recoger el sobrenadante y agregar 1 ml. de cloroformo, guardar en frío previa titulación del fago, usando JM1 como cepa indicadora.

2.- Transducción

- a) crecer 5 ml. de la célula receptora has $3-5 \times 10^9$ cel/ml.
- b) centrifugar el cultivo a 2500 rpm durante 10 min. y suspender las células en 1 ml. de Cac12 después de la resuspensión.
- c) diluir el lisado de P1 vir 1:10 en medio completo y aerear la dilución suavemente en un baño María rotatorio. (el lisado de P1 vir previamente crecido en la cepa donadora en la transducción (ver propagación de P1 vir)

- d) mezclar 0.5 ml. de la suspensión de células con 4.5 ml. de P1 vir aerado y dejar la mezcla, sin agitación, a temperatura ambiente (25 C) durante 30 min.
- e) transcurridos los 30 min., centrifugar la suspensión a 2500 rpm. durante 10 min. y resuspender las células, una vez separadas del sobrenadante, en un mililitro de solución salina.
- f) diluir 10^{-1} y 10^{-2} sembrar en medio selectivo.

3.- Conjugación.

- a) crecer la célula donadora a una concentración de $3-5 \times 10^9$ cel/ml.
- b) crecer la célula receptora a una concentración de $3-6 \times 10^9$ cel/ml.
- c) colocar 0.5 ml. de la célula donadora en un matraz con 10 ml. de medio completo.
- d) crecer la célula donadora a 35 UK (unidades Klett Summerson) y la receptora a 45 UK.
- e) mezclar 0.5 ml. de la donadora con 0.5 ml. de la receptora.
- f) centrifugar a 2500 rpm, durante 10 min. y resuspender en 1 ml. de solución salina.
- g) sembrar 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} en medio selectivo.
Control.- sembrar 0.1 ml. de la célula receptora en medio selectivo.

4.- Integración del factor R al cromosoma de E. coli

- a) crecer las células a $3-5 \times 10^9$ cel/ml. a 32 C en medio completo.
- b) diluir las células 1:10 y crecer a 60 UK a 32 C en medio completo.

- c) sembrar diluciones 10^{-5} ; 10^{-6} e incubar a 32 C en cajas de medio completo.
- d) sembrar diluciones 1:100 a 42 C en medio completo.
- e) contar colonias.

5.- Curación de episomas con rifampicina.

- a) crecer las células R^+ a 45 UK (unidades Klett Summerson) a 32 C. en medio completo.
- b) diluir a 10^2 cel/ml. en medio completo.
- c) agregar 10 ug/ml. de rifampicina.
- d) incubar las células tratadas a 32 C por 20 horas.
- e) aislar colonias e incubar a 32 C por 12 horas.
- f) probar resistencia a antibióticos.

6.- Curación de plasmidos por naranja de acridina.

- a) crecer las células a una concentración de 2×10^8 cel/ml. en medio completo.
- b) diluir las células a 10^2 cel/ml. en caldo completo, con pH=7.6. 20 ug/ml.
- d) incubar a 32 C durante 36 horas.
- e) aislar colonias e incubar a 32 C por 12 horas.
- f) probar resistencia a antibióticos.

RESULTADOS

1.- Construcción de una cepa con la mutación sensible a la temperatura.

De acuerdo a los datos presentados con respecto al fenómeno de supresión integrativa, se pensó en construir una cepa con la mutación *dnaA*, a la temperatura sensible. Se usó como cepa receptora de ésta mutación la cepa JM90, la razón es que se trata de una cepa multimarcada.

La cepa donadora de la mutación es la cepa Jm346 (Tabla 1).

Se construyó entonces la cepa JM275 sensibles a la temperatura por medio de una transducción usando para ello el fago transductante P1 vir., que fué crecido sobre la cepa donadora y las partículas resultantes se pusieron en contacto con la cepa receptora, se hizo una selección para el marcador Pyr E⁺ y buscando entre las colonias con esta característica aquellas células que coheredaron la mutación sensible a la temperatura, ya que el fago P1 vir cotransduce 2% del genoma de E.coli y estos marcadores están comprendidos en ese rango.

2.- Construcción de una cepa con la mutación sensible a la temperatura y un factor de resistencia a antibióticos R-100.

A la cepa JM275 se le transfirió un factor de resistencia R proveniente de la cepa JM104 (Tabla 1) por medio de una conjugación bacteriana, la cepa resultante recibió el nombre de JM277 (Tabla 1).

3.- Integración del factor de resistencia al genoma de la cepa JM277.

Haciendo un cambio de temperatura de 32C a 42C (36), se trató de integrar el factor de resistencia al genoma de las células en la cepa JM277, se buscaron colonias capaces de crecer a 42C. pensando que en éstas el factor R integrado en el genoma, replica al mismo. La cepa JM277 no era capaz de crecer a 42C.

Se usó como control de supresión integrativa a la cepa JM276 que es la cepa JM275 leu⁺ que lleva la mutación temperatura sensible pero no lleva el factor de resistencia R, la cual se trató en las mismas condiciones.

Se obtuvieron tres cepas diferentes ahora capaces de crecer a 42C: JM284a, JM284b y JM284c (Tabla 1).

4.- Demostrar que el factor de resistencia R está integrado en el genoma de las cepas no se curan del factor R, dicho factor puede estar integrado en el genoma de las células.

Como controles de la curación se usaron la cepa JM104, que es la cepa de donde se obtuvo el factor R, donde se encuentra éste mismo como episoma, se esperaba que esta cepa fuera curada, la cepa JM277 que tiene el factor R de la cepa JM104 como episoma, se esperaba que también fuera curada, también se esperaba que la cepa JM283 (Tabla 1) que es la cepa JM90 con el mismo factor R, se curara pero, solo se curó la cepa JM104, las cepas JM277 y JM283 no se curaron, por lo tanto este criterio no podía ser usado para demostrar la integración del plásmido ya que en cepas como JM283 y la JM277 sabemos que no está integrado el factor R, no hay curación.

Con respecto a este resultado se pensó en tres posibilidades:

- 1.- Se trataba de un fenómeno específico de la cepa JM90 y sus descendientes, JM277.
- 2.- Se debía a la mutación a la temperatura sensible que de alguna manera influyera para inhibir la replicación del DNA del plásmido.
- 3.- O bien, se trata un fenómeno específico del factor R en cuestión.

Se demostró que este fenómeno no era debido a la mutación a la temperatura sensible, tratando a la cepa JM276 a la que se le transfirió un factor sexual F'lac, que es la cepa JM279 y a la cepa JM90 se le transfirió el mismo factor F'lac y es la cepa JM281, con rifampicina en las condiciones de curación anteriores, estas cepas se curaron del episoma. A la cepa JM90 se le transfirió el factor R (JM283) y se trató con rifampicina en las mismas condiciones, no se curó.

Se concluyó que se trataba de un fenómeno específico de la cepa JM90 para factor de resistencia en cuestión, ya que este mismo factor se cura en la cepa JM104.

5.- Si el factor de resistencia R está integrado en el genoma, la cepa puede actuar como donador genético como lo hace una cepa Hfr. Para demostrar ésto se hizo una conjugación con cada una de las tres cepas JM284 a, b y c, como donadoras y una cepa receptora mutimarcada, JM361 (Tabla 1), para tratar de mapear el factor R, si es que está integrado en el genoma celular y determinar el senti-

do en que las cepas donadoras inyectan su material genético a la célula receptora.

Se encontró que el factor R se inserta cerca del gene que codifica para la biosíntesis de arg G, que se encuentra aproximadamente en el minuto 61 del mapa de E.coli.

Las tres cepas dieron el mismo resultado por lo que se piensa que se trata de una sola clona. Por frecuencia de marcadores se encontró que esta cepa donadora inyecta su ADN en el sentido de las manecillas del reloj.

6.- Por último se demostró que la mutación a la temperatura sensible aún está en la cepa donadora en cuestión, resultaba necesario demostrar este punto ya que podría tratarse de una reversión de la mutación sensible a la temperatura.

Por medio de un fago transductante se transfirió la mutación a la temperatura sensible de la cepa donadora a la cepa JM90, que es la cepa padre, ésta adquirió el marcador dnaA.

Los datos presentados aquí hacen pensar que el factor R está integrado en el genoma celular.

DESCRIPCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS LLEVADOS A CABO:

1.- Construcción de una cepa con la mutación sensible a la temperatura.

Para pasar la mutación *dnaA* a la cepa receptora, JM90, se creció el fago P1 vir (transductante) sobre la cepa JM346 *dnaA* y se infectó con las partículas virales obtenidas, a la cepa JM90 a una multiplicidad de infección de 0.15 a 32C, seleccionando para el marcador *Pyr E+* que se encuentra en el minuto 73 del mapa de E.coli, esperando cotransducir la mutación *dnaA* que se encuentra en el minuto 73.5 del mismo mapa, ya que el fago P1 vir es capaz de llevar los dos marcadores en su cabeza, cotransduce 2% del genoma de E.coli.

Se aislaron 80 colonias, se verificaron marcadores de la cepa receptora y además la mutación *dnaA*, estas células no son capaces de crecer a 42C.

12% de las colonias analizadas resultaron con los marcadores de la cepa receptora y sensibles a la temperatura, a esta cepa se le llamó JM275.

2.- Construcción de una cepa con la mutación *dnaA* y un factor de resistencia a antibióticos R.-

La cepa JM275 F^- thr^- leu^- ara^- pro^- pyr^- E^+ gal^- his^- xil^- mtl^- $argG^-$ $dnaA B^-$, es la cepa receptora del factor R, este factor se encuentra en una cepa con las siguientes características:

JM104 Rfi^+ thr^- leu^- lac^- TG^S y para transferir el factor R de esta cepa a la cepa receptora se pensó en hacer una conjugación, pero no

hay un marcador para hacer una selección positiva y buscar las células que hayan heredado el factor de resistencia, se pensó en hacer a la cepa JM275 leu^+ , para ésto, se hizo una conjugación de JM275 X JM1 (prototrofa Sm^S), se hizo una selección de células $leu^+ Sm^R$, - obteniendo la cepa JM276 (Tabla 1).

De esta manera puede hacerse la conjugación:

JM104 $Rfi^+ thr^- leu^- lac^- tG^S Sm^R Sul^R Cm^R Tc^R$.

X

JM276 $F^- thr^- leu^+ ara^- pro^- lac^- pyr E^+ gal^- his^- xil^- mtl^- arg G^-$
 $dna A B_1^-$.

↓

Seleccionando para leu^+ y buscando células R^+ .

JM277 $Rfi^+ thr^- leu^+ pro^- his^- arg G^- pyr E^+ gal^- lac^- xil^- mtl^- B_1^-$
 $dna A$.

Al mismo tiempo, se hicieron controles de la conjugación, pensando en la posibilidad de que la mutación sensible a la temperatura afectara de alguna manera la transferencia del factor sexual. El objeto de la siguiente conjugación es verificar que la cepa JM276 con la mutación $dna A$ - sea capaz de aceptar un plásmido, distinto de R como $F'lac$.

JM276 $F^- thr^- leu^+ ara^- pro^- lac^- pyr E^+ gal^- his^- xil^- mtl^- arg G^-$
 $B_1^- dna A$.

X

JM327 $F' (\Delta lac, pro) \Delta mZ$ del F' , $F'lac$, B_1^- , $Sup E$.

↓

JM279 $F' thr^- leu^+ ara^- pro^- gal^- his^- xil^- mtl^- arg G^- B_1^- dna A$

Además se hizo una conjugación para determinar si la cepa receptora sin la mutación dna A acepta un plásmido, en este caso F' lac.

JM90 F⁻ thr⁻ leu⁻ ara⁻ pro A⁻ lac⁻ pyr E⁻ arg G⁻ gal⁻ xil⁻ his⁻
mtl⁻ B₁⁻.

X

JM327 F' (Δ lac, pro) ΔmZ del F', F' lac B₁⁻.



Selección para lac⁺.

JM271 F' thr⁻ leu⁻ pyr E⁻ his⁻ arg G⁻ ara⁻ xil⁻ gal⁻ mtl⁻ lac⁻ B₁⁻
F' lac.

Se hizo otra conjugación para tratar de introducir el factor R a la cepa padre, JM90, que no lleva la mutación sensible a la temperatura esperando que fuera curada por rifampina, pero no se pudo curar.

JM90 F⁻ thr⁻ leu⁻ pro⁻ pyr E⁻ arg G⁻ ara⁻ lac⁻ gal⁻ xil⁻ mtl⁻ B₁⁻.
X his⁻.

JM104 Rfi⁺ thr⁻ leu⁻ lac⁻ tG^S Sm^R Sul^R Cm^R Tc^R.



Selección para lac⁺.

JM283 Rfi⁺ thr⁻ leu⁺ pro⁻ pyr E⁻ arg G⁻ ara⁻ lac⁻ gal⁻ xil⁻ his⁻
mtl⁻ B₁⁻.

3.- Integración del factor R al genoma de las células JM277.

Se esperaba como en el caso de supresión integrativa con el factor F, que las células con la mutación dnaA que no crecían a 42C, ahora lo lograrán, ya que el factor R podría replicar el cromosoma completo, suprimiendo la mutación dnaA. Se trató entonces de integrar el factor R al cromosoma celular, se crecieron las cepas JM276 (como control de la mutación dnaA) y la cepa JM277 a una concentración de 1×10^8 cel/ml. en medio líquido e incubando a 32 C.

Se sembraron las células en medio completo y los resultados se presentan en la Tabla 2:

TABLA 2. INTEGRACION DEL PLASMIDO DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS EN EL GENOMA DE E.coli

temperatura de incubación	cepa bacteriana	concentración
32 C	JM276	2×10^8 cel/ml.
32 C	JM277	2.4×10^8 cel/ml.
42 C	JM276	dilución 1:1000-2 col/ml.
42 C	JM277	dilución 1:1000-8 col/ml.

El hecho de que se encontraran colonias de la cepa JM276 a 42C se esperaba, ya que la mutación dnaA revierte a frecuencias relativamente altas. Las colonias revertantes y/o suprimidas que crecieron a 42 C de la cepa JM277, se verificaron y se usaron como control las células JM277 sin calentar, en las cuáles el factor R no está integrado al cromosoma celular sólo se encontraron tres colonias con las características de la cepa -- JM277 y que además podían crecer a 42 C, estas cepas son JM284a, JM284b y JM284c.

4.- Demostrar que el factor R está integrado en el genoma de las células JM284a JM284b y JM284 c.

Se trataron las cepas con rifampicina a una concentración de 10 ug/ml. y con anaranjado de acridina a una concentración de 20 ug/ml., después de haberlas crecido a una concentración de 1×10^8 cel/ml. a 32C, se aislaron colonias y se seleccionó para resistencia a cloramfenicol, se incubaron a 32 C y a 42 C, los resultados aparecen en la tabla 3.

T A B L A 3.- Curación de plásmidos con rifampicina y naranja de acridina.

Cepas	rifampicina (10 ug/ml.)	Naranja de acridina (25 ug/ml).
JM104	40%	100 %
JM277	-	-
JM284a	-	-
JM284b	-	-
JM284c	-	-
JM281	90%	100%
JM283	-	-
JM279	100%	100%

Se concluyó de estos experimentos que la cepa JM90 por algún mecanismo desconocido no puede ser curada del factor de resistencia R usado en estos experimentos para rifampicina y naranja de acridina a las concentraciones usadas.

Se esperaba que la cepa JM277 se curara, ya que lleva el factor R en el estado autónomo (como plásmidos), No se conoce la causa de este fenómeno.

5.- Si el factor de resistencia R está integrado en el genoma, la cepa puede actuar como donador genético como lo hace una cepa Hfr.-

Se seleccionó una cepa receptora adecuada, multimarcada, la cepa JM361, se llevó a cabo una conjugación bacteriana con las cepas donadoras JM284a, JM284b y JM284c, en las condiciones siguientes:

Se creció la cepa receptora a 37 C a una concentración de $3-5 \times 10^9$ cel/ml. Las células donadoras se crecieron a $3-5 \times 10^9$ cel/ml. a 42 C ó sea un cultivo sobrecrecido. Se tomaron alícuotas de las células donadoras y se crecieron a 35 UK (unidades Klett Summerson) y la célula receptora se creció a 45 UK.

Se pusieron en contacto cada una de las células macho con la célula hembra en una relación de 1:3 durante 90 minutos, se plantearon en cajas de medio mínimo seleccionado un marcador de la cepa receptora a la vez. Se incubaron a 37 C.

Los resultados se presentan en la tabla 4.

TABLA 4.

CEPA RECEPTORA	CEPA DONADORA	MARCADORES SELECCIONADOS (colonias /ml)						
		argG	his	trp	ade	leu	met	ilv
JM36I	JM284a	90	23	24	5	5	—	—
JM36I	JM284b	85	27	19	4	6	—	—
JM36I	JM284c	95	22	15	6	5	—	—
JM36I	JM277	—	—	—	—	—	—	—
FRECUENCIA DE MARCADORES		4.5×10^{-7}	1.25×10^{-7}	1×10^{-7}	2.5×10^{-8}	2.5×10^{-8}	—	—

FRECUENCIA DE MARCADORES DE LOS EXPERIMENTOS DE CONJUGACION DE LAS CEPAS JM284 x JM36I.

Según el mapa de E. coli, esta cepa Hfr (según los resultados obtenidos, sólo es una clona en realidad) inyecta su ADN en sentido de las manecillas del reloj y el factor R se encuentra cerca del gen que codifica para la biosíntesis del marcador arg G, que se encuentra en el minuto 61 del mismo mapa, como se vé en la tabla 4, esta región del cromosoma de la bacteria es la que presenta la mayor frecuencia de recombinación y es la que se transfiere en primer lugar a la célula receptora, el factor de resistencia R es el último en pasar. (Fig. 5)

Se comprobó que esta cepa es resistencia a antibióticos de este factor R; para ésto se crecieron en medio completo con cloromicetina y tetraciclina por separado y resultaron resistentes a éstos.

6.- Por último se demostró que la mutación temperatura sensible está presente en la cepa JM284, (este experimento se hizo con las tres cepas JM284a, JM284b y JM284c)

Con el bacteriófago P1 vir se infectó a cada una de las cepas JM284 a, b y c. Y con las partículas resultantes de esta infección se hizo una transducción sobre la cepa JM90, que es la cepa padre de las cepas JM284 a, b y c, seleccionando para el marcador pyr E⁺ que se encuentra en el minuto 62.3 del mapa de E. coli y buscando entre estas colonias, las que coheredaron el marcador dnaA de las cepas JM284 a,b y c, que se encuentra en minuto 73.5 del mismo mapa. (Fig. 5) Ahora las cepas JM90 adquirieron sensibilidad a la temperatura.

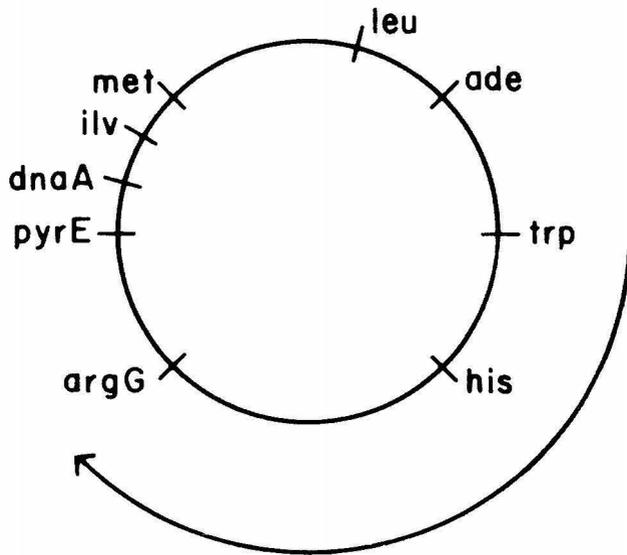


FIG.5 MAPA DE LA CEPA Hfr AISLADA DE LA CEPA JM90 *dnaA/Rfi.*[†]

Los resultados se presentan en la Tabla 5.

T A B L A 5.

<u>Bacteriófagos</u>	<u>cotransducción</u>
JM284a P1 vir S.JM90	15.9 %
JM284b P vir S.JM90	16 %
JM284c P vir S.JM90	15 %
JM277 P vir S.JM90 (control)	17 %

Cotransducción con el fago p vir (JM284 a,b y c) sobre la cepa JM90. Seleccionando para el marcador Pyr E⁺.

Entonces se concluye que la mutación dnaA está presente en la cepas JM284 a,b y c. Se usó como control de la transducción la cepa JM277 que tiene la mutación adnA y el factor de resistencia en su citoplasma. Este resultado habla de que si las células son capaces ahora de crecer a 42 C se debe a que el factor de resistencia R se integró en el cromosoma celular y puede replicar el cromosoma completo y -- que la mutación dnaA, persiste en la cepa Jm284.

D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S

En 1972, Caro reportó el fenómeno de supresión integrativa con el factor sexual F. (59).

De acuerdo a estos datos se pensó en la posibilidad de tratar de repetir este fenómeno con otros episomas, en particular con el factor de resistencia a antibióticos R.

Por los experimentos llevados a cabo, se llegó a la conclusión de que el factor R se integra al cromosoma celular y es capaz de replicar el cromosoma de la célula ya que ésa debido a la mutación dnaA no puede hacerlo.

Cuando se trataba de demostrar este fenómeno, se encontró que la cepa seleccionada como receptora de la mutación dnaA y del factor R, la cepa JM90, tiene un problema por el cuál no puede ser curada del factor R, cuando este se encuentra en el estado autónomo, sin embargo se demostró que esta misma cepa puede curarse de otros episomas en el estado autónomo como el factor F'lac.

Se decidió seguir el proyecto original aunque esto resultaba interesante.

Después de haber integrado el factor R al cromosoma celular, se aislaron tres colonias, se esperaba que fueran distintas entre sí ya que para entonces se sabía por el trabajo de Caro que el factor R puede integrarse en cualquier lugar del cromosoma de E. coli. (62)

Por los experimentos hechos se llegó a la conclusión de que sólo se tenía una clona y no tres, ya que la frecuencia de marcadores era la misma en las tres cepas.

Según los resultados de la tabla 4, el factor R se encuentra cerca del gene que codifica para la biosíntesis de arginina G en el minuto 61 del mapa de E. coli, e inyecta su ADN en sentido de las manecillas del reloj. (Fig. 5)

Se sabe que en una cepa Hfr, el primer marcador que se transfiere a la cepa receptora durante una conjugación, es el, inmediato al sitio de integración del episoma y éste es el último en transferirse, El sentido de inyección del ADN se determina por la frecuencia de marcadores, el marcador que pasa primero durante la transferencia de material genético es el que tiene mayor frecuencia de recombinación, en el caso de nuestros experimentos el marcador con mayor frecuencia de recombinación es arg G, le siguen his, trp, ade, leu, met e ilv, por lo que deduce que el ADN en la cepa JM284 es inyectado en sentido de las manecillas del reloj, por la resistencia a cloramfenicol se probó que el factor de resistencia está presente en esta cepa. Cuando se estaba tratando de transferir el factor de resistencia a la cepa JM361, Caro reportó el aislamiento de cepas Hfr del factor R y del factor Col V2⁺ en E. coli usando el criterio de supresión integrativa, reportó que de 120 colonias probadas, cuatro fueron F⁺, nueve resistentes a cloramfenicol, pero no transfirieron marcadores Hfr. Caro obtuvo una eficiencia de transferencia alta en sus experimentos: 20% de recombinantes ara⁺ str⁻ después de 30 minutos de contacto celular y 5-80 % después de 60 minutos, obtuvo resultados similares con otras cepas.

En la figura 6 se muestra un mapa de cepas Hfr obtenido por Caro con el factor R100-1. Con estos experimentos llegó a la conclusión de que el factor de resistencia R100-1 puede integrarse en cualquier lugar del cromosoma de E. coli y que estas cepas son estables.

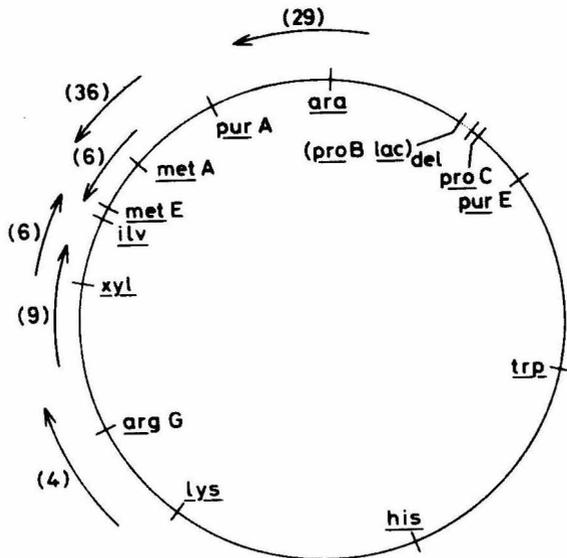


FIG.6 Mapa de cepas Hfr aisladas de la cepa LC343/R100-1⁺, obtenida por Caro, L.

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco profundamente a los Dres. Jaime Martuscelli, Francisco Bolivar y a todas las personas que de una u otra forma, me brindaron su apoyo, colaboración y estímulo durante la realización de este trabajo.

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

- 1.- Jacob, F., and Wollman. 1961. Sexuality and the genetics of bacteria. Academic Press, N.Y.
- 2.- Cavalli, L.L., J. Lederberg, and G.M. Lederberg. 1953. An infective factor controlling sex compatibility in Bacterium coli. J. Gen Microbiology. 8:89-103.
- 3.- Lederberg, J., and E.L. Tatum. 1946. Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 11:113-114.
- 4.- Tatum, E.L. and J. Lederberg. 1947. Gene recombination in the Bacterium coli. J. Bacteriol. 53:673-684.
- 5.- Hayes, W. 1952. Recombination in Bact. coli K-12. Unidirectional transfer of genetic material. Nature. 169:118.
- 6.- Hayes, W. 1953. Observations on a transmissible agent determining sexual differentiation in Bact. coli. J. Gen Microbiol. 8:72-88.
- 7.- Clark, A.J., and Adelberg, E.A. 1962. Ann. Rev. Microbiol. 16:289.
- 8.- Hirota, Y. 1960. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 46:57.
- 9.- Duguid, J.P., E.S. Anderson y E. Campbell. 1966. Fimbriae and adhesive properties in Salmonella. J. Pathol. Bacteriol. 92:107-138.
- 10.- Duguid, J.P., I.W. Smith, G. Dempster, and P.N. Edmunds. 1955. Non flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in Bacterium coli. J. Pathol. Bacteriol. 70:335-348.

- 11.- Erinton, C.C. 1959. Non flagellar appendages of bacteria. Nature. 183:782-786.
- 12.- Meynell, G.G. and A.M. Lawn. 1967. Sex pili and common pili in the conjugational transfer of colicin factor Ib by Salmonella typhimurium Genet. Res. 9:359-367.
- 13.- Mulczyk, M., and J.P. Duguid. 1966. Influence of the colicinogenic factor coll between strains of Sh. flexneri. J. Gen. Microbiol. 45:459-477.
- 14.- Brinton, C.C. 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacteria pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram-negative bacteria. Trans. N.Y. Acad. Sci. 27:1003-1054.
- 15.- Ishibashi, M. 1967. F pilus as f⁺ antig. J. Bacteriol. 93:379-389.
- 16.- Hirota, Y., T. Fujii, and Y. Nishimura. 1966. Lose and repair of conjugal fertility and infectivity of the resistance factor and sex factor in E. coli. J. Bacteriol. 91:1298-1304.
- 17.- Adelberg, E.A., and J. Pittard. 1965. Chromosome transfer in bacterial conjugation. Bacteriol. Rev. 29:161-172.
- 18.- Brinton, C.C., P. Censky and J. Carnahan. 1964. A new type of bacterial pilis genetically controlled by the fertility factor on E. coli K-12 and its role in chromosome transfer. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52:776-778.
- 19.- Datta, N., A.M. Lawn, and E. Meynell. 1966. The relationship of F type piliation and phage sensitivity to drug resistance transfer in R⁺ F- E. coli K-12. J. Gen. Microbiol. 45:365-367.

- 20.- Orskov, I., and F. Orskov. 1960. An antigen termed f^+ occurring in F^+ E. coli K-12. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 48:37-41.
- 21.- Akiba, T., T. Koyama, T. Ishiri, S. Kimura y T. Fukushima. 1960. Studies on the mechanism of development of multiply drug-resistance Shigella strains. Nihon (ji Sh po. 1886: 45-50.
- 22.- Mitsuhashi, S.K. Harda and Hashimoto. 1960. Multiple drug resistance to other bacteria by mixed cultivation. Jap. J. Exp. Med. 30:179-189.
- 23.- Egawa, R.Y. and Hirota. 1962. Inhibition of fertility by multiple drug resistance factor (R) in E. coli K-12. Jap. J. Genetic. 37:66-69.
- 24.- Watanabe, T. and T. Fukusawa. 1962. Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceas. J. Bact. 83:727-735.
- 25.- Akiba, T., and M. Yoshikawa. 1962. Inhibition of plaque formation of phage P1 and R factors. Med. Biol. (Tokyo) 65:6-10.
- 26.- Watanabe, T., T. Fukawawa, and T. Takano. 1962. Conversion of male bacteria of E. coli K-12 to resistance to phages by infections with the episome "resistance transfer factor" Virology 17:217-219.
- 27.- Watanabe, T.H. Nishida, C. Ogata. T. Arai. 1964. Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceas. J. Bacteriol. 88:716-726.

- 28.- Watanabe, T. y T. Fukusawa. 1961. Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceas. I. Transfer of resistance factors by conjugation. J. Bacteriol. 81:669-678.
- 29.- Meynell, E. and N. Datta. 1965. Functional homology of the sex factor and resistance transfer factors. Nature. 207:884-885.
- 30.- Meynell, E., and N. Datta. 1966. The relation of resistance transfer factors to the F factor of E. coli K-12. Genet. Res. 7:134-140.
- 31.- Dobnau, E., and B.A.D. Stocker. 1964. Genetics of plasmids in Salmonella typhimurium. Nature. 204:1112-1113.
- 32.- Lawn, A.M., E. Meynell, G.G. Meynell, and N. Datta. 1967. Sex pili and the clasification of sex factors in the Enterobacteriaceas. Nature. 216:343-346.
- 33.- Jacob, F. and J. Monod. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3:318-356.
- 34.- Nishimura, Y.M., Ishibashi, E. Meynell, and Y. Hirota. 1967. Specific piliation directed by a fertility factor and a resistance factor of E. coli. J. Gen. Microbiol. 49:89-98.
- 35.- Meynell, G.G., and A.M. Lawn. 1967. Sex pili and common pili in the conjugational transfer of colicin factor Ib by Salmonella typhimurium. Genet. Res. 9:359-367.
- 36.- Cuzin, F. 1962. Mutants defectifs de l'episome sexual chez E. coli K-12. Compt. Rend. 255:1149-1151.

- 37.- Gallucci, E., and G. Sironi. 1964. A defective sex factor in E. coli K-12 *Giorn. Microbiol.* 12:175-182.
- 38.- Meynell, E., and Datta. 1967. Mutant drug resistance factors of high transmissibility. *Nature* 214:885-887.
- 39.- Meynell, Proc. European Phage Meeting, 1967, p. 14.
- 40.- Mitsuhashi, S. 1968.
- 41.- Rothman, J.R. 1965. Transduction studies on the relation between prophage and host chromosome. *J. Mol. Biol.* 12:892.
- 42.- Dowe, W.F. and Yanofsky, C. The linear insertion of the prophage into the chromosome of E. coli shown by deletion mapping. *Biochem. Biophysics. Res. Comm.* 18:910.
- 43.- Kellenberger, G., Zichichi, M.L. and Wiegler, J. A mutation affecting the DNA content of phage lambda. *J. Mol. Biol.* 3:399 (1961).
- 44.- Signer, E. and Bechwith, J. 1966. Transposition of the lac region of E. coli. III The mechanism of the attachment of phage 80 *J. Mol. Biol.* 22:83.
- 45.- Zissler, J. "integration negative (int) mutants of phage lambda". *Virology* 31:189 (1967).
- 46.- Thomas C. "The role of the ring". 1966. *J. cell Physiol.* 70:13.
- 47.- Matuscelli, J., Taylor, A.L., Cumming, D.L., Chapman, V.A., Delong, S.A., and Cañedo, L. 1971. Electron microscopy evidence for linear insertion of bacterio phage Mu-1 in lisogenic bacteria. *J. Virology.*
- 48.- Campbell, A.M. "Episomes". Harper and Row, Publishers. N.Y. Evanstend and London. (1966).

- 49.- Berg, C.M. and Caro, L.G. "Chromosome Replication in E. coli.
J. Mol. Biol. (1967) 29:431.
- 50.- Cairns, J. 1963. The chromosome of E. coli. Cold
Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 28:43-46.
- 51.- Jacob, F. S. Brenner, and F. Cuzin. 1963. On the regulation
of DNA replication in bacteria, Cold Spring Harbor, Symp.
Quant. Biol. 28:329.
- 52.- Nagata, T. 1963. The molecular synchrony and sequential
replication of DNA in E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci.
49:551.
- 53.- Nishi, A. T. Horiuchi. 1966. Beta galactosidase formation
controlled by an episomal gene during the cell cycle of
E. coli. J. Biochem. 60:338.
- 54.- Oishi, M. H. Yoshikawa, and N. Sueoka. 1964. Synchronous
and dichotomous replications of the Bacillus subtilis
chromosome during spore germination. Nature. 204:1069.
- 55.- Caro, G.L. and Berg, M.C. 1968. Chromosome replication
in some strains of E. coli K-12. Cold Spring Harbor
Symposia on Quant. Biology. 33:559-573.
- 56.- Caro, L. and Berg, C.M. Chromosome replication in E. coli
II.- Origin of replication in F⁻ and F⁺ strains. J. Mol.
Biol. 1969. 45:325-336.
- 57.- Caro, L.G. 1970. "Chromosome replication in E. coli.
III.- Segregation of chromosomal strands in multiforked
replication. J. Mol. Biol. 48:329-338.
- 58.- Bird, R.E., Lovarn, J., Martuscelli, J., and Caro, L.G.
- 59.- Nishimura, Y. and Caro, L. 1971. Chromosome replication
in E. coli. IV.- Control of chromosome replication and cell
division by an integrated episome. J. Mol. Biol. 55:441-445.

- 60.- Hirota, Y. Mordoh J. and Jacob, F. 1970. J. Mol. Biol. 53:369.
- 61.- Shapiro, B.M., Siccardi, A.G., Hirota Y. and Jacob, F. 1970. J. Mol. Biol. 52:175.
- 62.- Nishimura, A., Nishimura, Y. and Caro, L. "Isolation of Hfr strains from R⁺ and Col V2⁺ strains of E. coli and derivation of an R' lac factor by transduction. J. Bacteriol. 116:1107-1112.
- 63.- Jacob, F. and Wollman, E.L. 1961. Sexuality and the genetics of bacteria (Academic Press N.Y.)
- 64.- Hirota, Y. 1960. The effect of acridine dyes on mating type factors in E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 46: 57-64.
- 65.- Tocchini-Valentini, G.P. y Crippa, M. 1971. Second Lepetit Colloquium on Oncogenic viruses, ed. Silvestri, L. (North Holland Publishing, Co., Amsterdam, p. 237-243.
- 66.- Bazzicalupo, P., and Tocchini-Valentini, G.P. "Curing of an E. coli episome by Rifampicin (acridine orange/F⁺/F⁻/Hfr/lac). Proc. Nat. Sci. U.S.A. 1962. 69:No. 2, p. 298-300.
- 67.- Brutlag, D., Schekman, R. y Kornberg, A. 1971. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68:2826-2829.
- 68.- Dove, W.F., Hargrove, E., Ohashi, M., Hangle, F. y Guha, A. 1969. Japan. J. Genet. 44: Suppl. 1, 11-12.
- 69.- Taylor, A.L. Current linkage map of E. coli. Bacteriol. Rev. 34:155, 1970.