

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Quimica

TRANSGENOSIS EN E. coli K₁₂.

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

p r e s e n t a:

FEDERICO ESTEBAN SANCHEZ RODRIGUEZ

México, D. F.

1975

326



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tesis
1975
M.F. 3104

A mis mejores amigos:

Mis Padres y Hermanos:

A Carmen :

Mi más sincero agradecimiento para -
Francisco Bolívar y Jaime Martuscelli,
no solo por impartirme la mejor tuto-
ría y formación sino por haberme ofre-
cido, estímulo y dedicación y amistad.

I N D I C E

	Pág.
ANTECEDENTES	1
GENERALIDADES	3
MATERIALES Y METODOS	20
a).- Materiales.	20
b).- Métodos	28
RESULTADOS	38
a).- Transformación en <u>E. coli</u> K ₁₂ recB ⁻ recC ⁻ sbcB ⁻	38
b).- Transformación en <u>E. coli</u> K ₁₂ recB ⁻ recC ⁻ sbcB ⁻ hsr ⁻	45
c).- Transformación en <u>E. coli</u> K ₁₂ recB ⁻ recC ⁻ sbcB ⁻ ara leu	49
d).- Construcción de <u>E. coli</u> K ₁₂ recB ⁻ recC ⁻ sbcB ⁻ hsr ⁻ pirA ⁻ (Mu-1)	50
e).- Transformación de la cepa anterior	51
f).- Datos genéticos que indican que el segmento de DNA de <u>Salmonella</u> o de <u>E. coli</u> que lleva la información - responsable de la biosíntesis de ar- ginina y de pirimidinas introducido por transformación en la cepa JM 263, está integrado.	51

	Pág.
DISCUSION Y CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFIA.	67

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ
VOCAL: JOSE DE J. MANRIQUE
SECRETARIO: FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA
1er. SUPLENTE: VICTORIA VALLE SANCHEZ
20. SUPLENTE: JAIME MARTUSCELLI

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM.

SUSTENTANTE:

FEDERICO ESTEBAN SANCHEZ RODRIGUEZ

ASESOR DEL TEMA:

FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA

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

Existe una serie de datos que hablan de la posibilidad de introducir y en algunos casos de estabilizar material genético de un organismo en otro. Es claro la importancia que esto tiene para el hombre en cuanto a la posibilidad de generar una verdadera Ingeniería Genética.

Escherichia coli resulta el organismo idóneo como aceptor de material genético por el amplio conocimiento que de esta bacteria se tiene, así como por el gran número de procedimientos genéticos que permiten manipular pequeños y selectos segmentos de su DNA.

Ya se ha demostrado que es posible transformar a E. coli K₁₂ en un ambiente genético recB recC y sbcB usando DNA lineal. Pero tal vez son aún mas importantes los trabajos de Cohen et al en donde se demuestra la formación de plásmides híbridos de DNA entre un plásmide de Salmonella panama y otro de E. coli, así como también entre un factor de resistencia a antibióticos de E. coli y los genes responsables de la producción del RNA ribosomal en Xenopus laevis, todo esto gracias al uso de una endonucleasa de restricción de E. coli. También ha sido posible la introducción de estas estructuras híbridas en E. coli por transformación. Sin embargo cabe mencionar aquí que no ha sido posible transformar a E. coli con DNA lineal interespecífico.

En nuestro laboratorio hemos logrado la transformación heteróloga de E. coli utilizando como donador el DNA de otra enterobacteria como S. typhi. El receptor debe de ser una mutante que no posea el sistema de restricción genética. Analizando las transformantes por experimentos de cotransducción, cotransformación, "curación" por medio de colorantes y por rifampicina así como también ensayos enzimáticos se logró demostrar que el fragmento del DNA transformante ha sido integrado por un verdadero proceso de recombinación genética y no se encuentra como un --episoma. Se encontró además que las regiones de homología son importantes para lograr este proceso.

No se ha logrado demostrar que exista transformación en E. coli K₁₂ cuando se usa como donador DNA de otras fuentes que no sean enterobacterias.

GENERALIDADES

Tres son los mecanismos de intercambio genético en bacterias:

- a). Transformación
- b). Transducción
- c). Conjugación

En cada uno, una porción del material genético de una célula es introducido dentro de otra, dando origen a un merodiploide o cigoto parcialmente diploide. El material genético introducido de una célula donadora generalmente no puede permanecer como una entidad que se pueda multiplicar independientemente, sin embargo, recombinantes genéticas como -- por ejemplo clonas de células que tienen características tanto de la célula donadora como de la receptora, pueden originarse de los cigotos, como resultado del intercambio genético entre regiones homólogas de los genomas originales.

En la transformación el agente de transferencia es DNA purificado procedente de la cepa donadora.

En la transducción, son los bacteriofagos los que actúan como vectores del material genético. Ambos procesos generalmente involucran la transferencia de cantidades relativamente pequeñas de información genética y su estudio ha sido de gran importancia para elucidar la naturaleza -

química y estructura del DNA. Cabe señalar, sin embargo, que el conocimiento de la organización global del material genético en bacterias se ha obtenido principalmente a partir del estudio de la conjugación, por medio de la cual pueden ser transferidas "grandes cantidades" de material genético; a veces un genoma bacteriano completo.

Los estudios de Lederberg(1) y colaboradores, así como los de Jacob y Wollman (3) y Hayes (10) han permitido establecer que los determinantes genéticos de las características de E. coli están dispuestos de manera lineal en una estructura única o cromosoma. Esto mismo se ha sugerido que ocurre en el caso de todas las otras enterobacterias y algunos bacilos y actinomicetales gracias a trabajos de conjugación en estas cepas (4). Por otro lado también se tienen evidencias tanto físicas como genéticas de que el cromosoma de E. coli K₁₂ es una estructura circular-cerrada, es decir sin extremos. (2)

CONJUGACION:

La capacidad de conjugar es conferida a una célula por la presencia de DNAs circulares extracromosomales (5) y (6) que pueden replicarse independientemente del cromosoma bacteriano, los cuales pueden ser transferidos con alta frecuencia durante la conjugación. Estos están estrechamente relacionados con otros elementos extracromosomales tales como profagos (1), factores responsables de la producción de colicinas (4) y de la resistencia extracromosomal a antibióticos (5). El análisis de los estudios que se han hecho sobre conjugación han permitido demostrar que algunos o casi todos pueden existir en dos estados alternativos; un estado autónomo en el cual son transferidos independientemente del cromosoma bacteriano y otro "integrado" (7) en donde son transferidos como genes cromosomales. Tales determinantes reciben el nombre de episomas y en algunos casos, como es el del profago P₁, (8) el nombre de plásmidos el cual ni se integra en el cromosoma ni es transferido a otra cepa por conjugación.

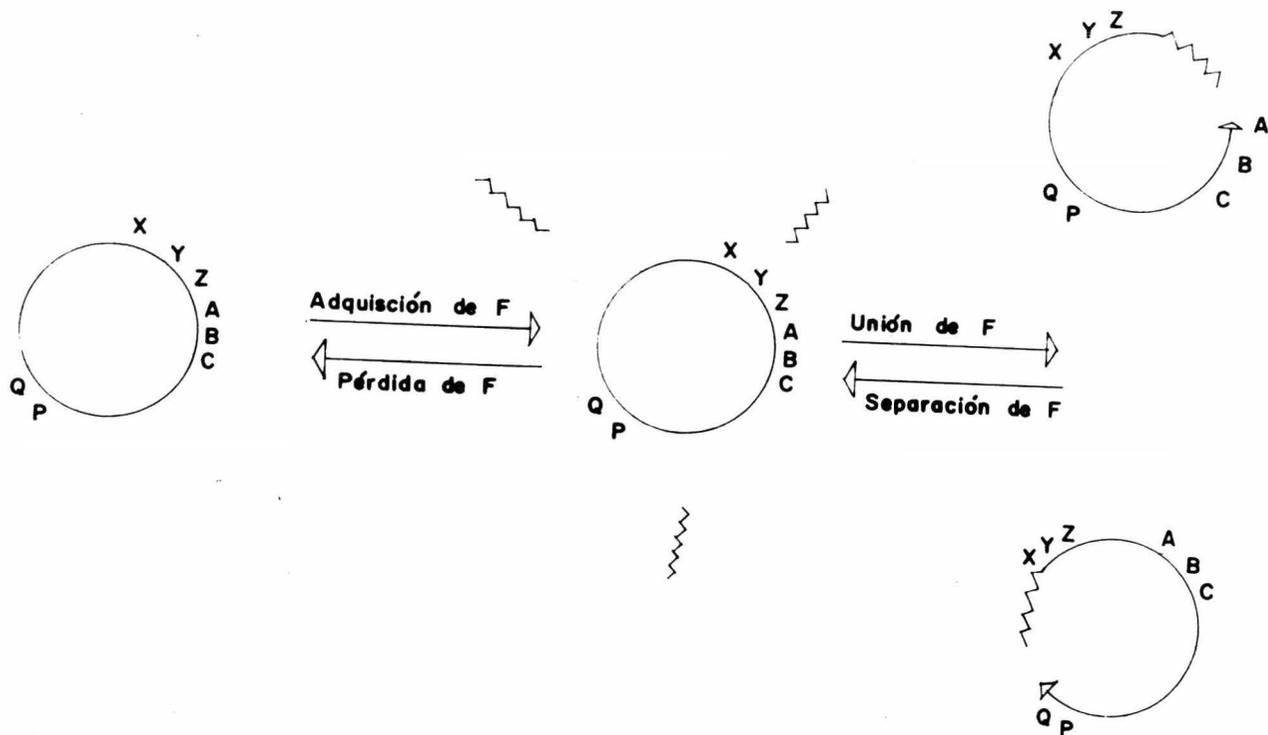


Fig. 1.- Representación diagramática de los tipos sexuales en *E. coli* K12. El factor F está indicado por la línea corta en zigzag. Las letras representan marcadores cromosomales hipotéticos y las flechas los extremos delanteros (orígenes) de dos posibles tipos de Hfr.

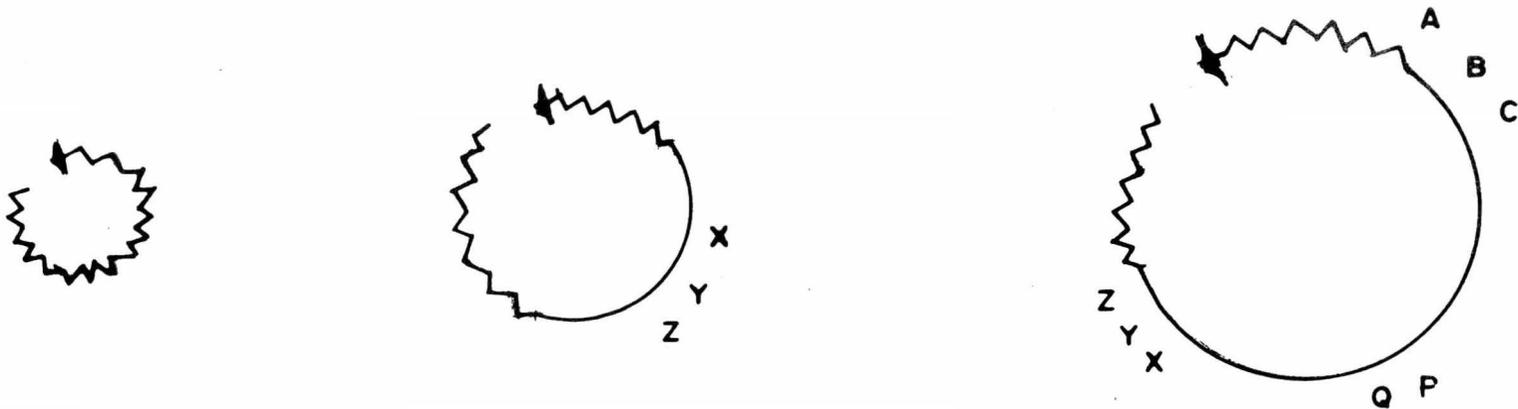


Fig. 2.- Representación hipotética de factores F y F' y de un cromosoma Hfr. El material genético del factor F está representado por una línea en zigzag y el del cromosoma bacteriano por una línea continua. Las flechas indican el extremo de cada estructura que primero penetra en la célula receptora y las letras representan marcadores cromosomales hipotéticos.

No todas las cepas pueden conjuguar, existen cepas que actúan como donadoras (machos) y otras que siempre son receptoras (hembras). El episoma "F" (fertilidad) representa aproximadamente el 1% del cromosoma bacteriano en tamaño, denominándose F^+ a la cepa que lo posee, siendo de carácter dispensable para la célula y el responsable de que el donador (macho) sintetice una proteína llamada pilina, la cual se ensambla para formar estructuras conocidas como pili las cuales establecen el puente citoplasmático por donde pasa el DNA hacia la cepa receptora (F^-). (9).

El episoma F de una cepa F^+ eventualmente puede integrarse en el cromosoma mediante un mecanismo de recombinación. A las cepas que tienen el factor F integrado se les denomina Hfr(10) (alta frecuencia de recombinación). Esto le confiere la propiedad de "donar" el cromosoma o por lo menos parte de él, empezando a pasar hacia la receptora por el sitio donde se integró, ocurriendo esto tanto en el sentido de las manecillas del reloj como en sentido contrario, dependiendo de la dirección de integración del episoma. El factor F permanece en el extremo terminal del cromosoma y rara vez es transferido ya que el puente citoplasmático es mantenido generalmente por corto tiempo. La ruptura del puente citoplasmático detiene la transferencia y por lo tanto rara vez llega a pasar todo el cromosoma completo, dando por resultado que la exconjugante de un Hfr X F^- casi siempre sea una bacteria F^- . Ver figura 1 y 2.

El fenómeno de conjugación se presenta en diversos niveles de la escala biológica: Bacterias, Actinomicetales, Hongos superiores y ciertos protozoarios, sin embargo es un mecanismo exclusivo y específico de individuos filogenéticamente muy parecidos como es el caso de las enterobacterias.

TRANSDUCCION:

En 1952 Zinder y Lederberg demostraron que ciertos virus bacterianos temperados pueden actuar como vectores en la transferencia -

de genes bacterianos de una línea de células a otra. Este fenómeno se observó primero con el fago PLT₂₂ en Salmonella y ha sido extensamente estudiado con varios fagos de enterobacterias en géneros como Pseudomonas, Bacillus y Micrococcus y en actinomicetos, lo que sugiere que sea un fenómeno general entre las bacterias. (4) y (12).

La transducción consiste básicamente en que una pequeña parte del cromosoma de una célula infectada por un virus puede eventualmente llegar a ser empacada dentro de la cápside de una partícula viral durante la infección fágica, los genes provenientes del huésped original - pueden ser incorporados en el cromosoma de la segunda célula por medio - de un proceso de recombinación. (13) Ver figura 2.

Hay dos tipos principales de fagos transductantes:

- a). Generalizados
- b). Especializados

Los fagos generalizados pueden ser portadores de cualquier - parte del cromosoma bacteriano ya sea porque se puedan integrar en cualquier sitio del cromosoma bacteriano como es el caso de fago Mu-1 o porque nunca se integra como es el caso del de P₁ el cual en la fase tardía de la infección produce nucleasas las cuales degradan el cromosoma bacteriano en una variedad muy grande de fragmentos, eventualmente algunos de estos pueden ser del mismo tamaño que el genoma del fago por lo cual pueden ser "empacados" en la cápside viral.

La transducción generalizada generalmente ocurre en las cepas que poseen un profago integrado en un locus específico del cromosoma huésped el cual recibe el nombre de sitio de unión del profago. Sólo los loci inmediatos adyacentes a este sitio pueden ser transducidos. Un ejemplo de esto lo constituye el fago temperado Lambda de E. coli K₁₂ el - - cual se integra de manera lineal en el minuto 17.4 del cromosoma de E. coli entre el marcador de gal y el de bio (conjunto de genes responsa --

bles de la utilización de la galactosa como fuente de carbono y la producción de biotina respectivamente). Como producto de la escisión aberrante se pueden tener fagos Lambda defectivos que llevan estos loci y así tenemos un Lambda gal o un Lambda bio respectivamente. (14)
Ver figura 3.

TRANSFORMACION:

El fenómeno de la transformación fué descubierto por Griffith (15) al estudiar la inmunidad a infecciones por neumococo en ratones. -- Cuando inyectaba subcutáneamente a ratones, unos cuantos neumococos capsulados (tipo S o liso) los ratones morían en dos días, por otro lado so sobrevivían cuando se les inyectaba neumococos no capsulados (tipo R o rugoso). Sin embargo si estos últimos eran inyectados junto con neumococos del tipo S muertos por calor (vacuna) se desarrollaba otra vez una septicemia generalizada y los ratones morían, pudiéndose aislar de la sangre, neumococos del tipo S vivos. En este tiempo se pensó que era el polisacárido de la pared el responsable de esta transformación. Posteriormente Sia-Dawson (16) observaron que esta sustancia no era precisamente el polisacárido pudiendo lograr una transformación in vitro aunque no identificaron el principio activo responsable.

El descubrimiento e identificación química del principio activo fué hecho por Avery, Macleod y Mc Cartey en 1944 (17). Se observó que pequeñísimas cantidades del agente (1 nanogramo/ml) producía bacterias transformantes pero que cualquier cantidad deseada podía ser extraída subsecuentemente a partir de una clona transformante, lo que sugería que el agente estaba siendo sintetizado y transmitido a la progenie en las células transformantes.

El significado del descubrimiento de Avery et al culminó en reconocer que el DNA es el almacén del material genético y que puede ocurrir recombinación entre el genoma de una bacteria viva y el DNA de --

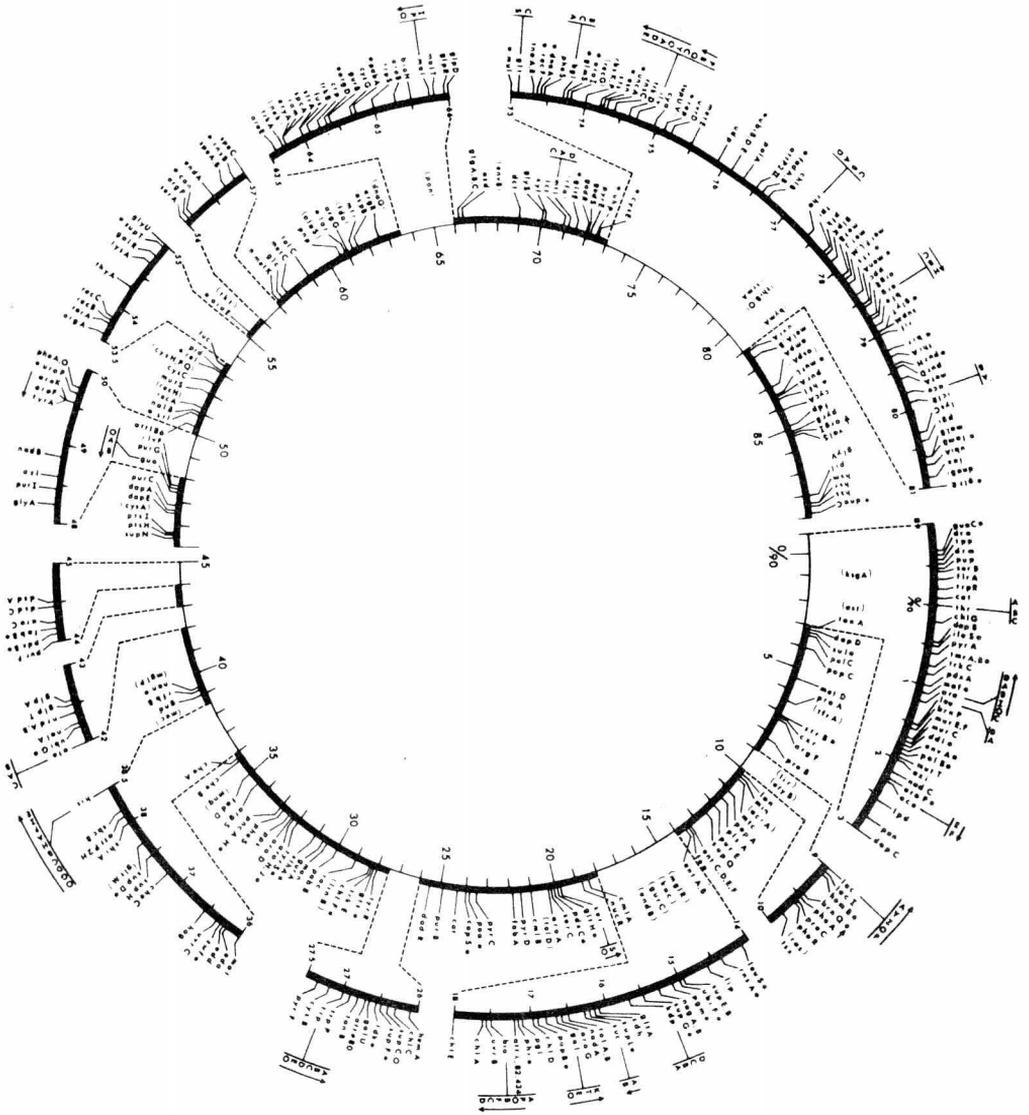


Figura 3.- Cromosoma de *Escherichia coli* (de acuerdo con A. Taylor 1973).

una bacteria muerta liberado al medio.

EVENTOS MOLECULARES EN LA TRANSFORMACION GENETICA.

Para que un marcador genético que se encuentra presente en el DNA en solución forme parte del genoma bacteriano debe penetrar en una célula competente, aparearse con su contraparte cromosomal (sinapsis) y de alguna manera recombinar con el cromosoma (integración). La culminación a nivel celular del evento requiere que haya división celular (replicación de los núcleos transformados) y síntesis de novo de enzimas y metabolitos (expresión fenotípica).

1). COMPETENCIA:

Es el estado transitorio fisiológico que le confiere a las células una mayor susceptibilidad a la penetración de ácidos nucleicos.

Aparece solo bajo condiciones de cultivo muy especiales por ejemplo en Pneumococcus o Hemophilus se requiere un medio de cultivo -- muy rico y en caso de B. subtilis es indispensable un medio mínimo (18 y 19).

La fase de crecimiento en la cual aparecen células competentes varía también con las especies de que se trate: Así por ejemplo se tiene que en el caso de Rhizobium (20) aparece en la fase temprana y por el contrario en la tardía en Hemophilus (21), en B. subtilis se presenta en la fase exponencial y al esporular y en Pneumococcus es una función -- del inóculo inicial. (22).

Existen dos hipótesis que explican desde el punto de vista fisiológico el fenómeno de competencia.

De acuerdo con una, la competencia de una célula es el resultado de alteraciones producidas en la pared, las cuales hacen posible la penetración de macromoléculas (23).

La segunda hipótesis propone que la competencia de una célula está determinada por la síntesis de receptores específicos en la superficie bacteriana, esto se ve apoyado por el hecho de que la competencia no se presenta si la síntesis de proteínas se encuentra inhibida como por ejemplo en Bacillus subtilis.

También ha sido posible purificar parcialmente un factor extracelular el cual es capaz de inducir competencia en cultivos que originalmente no eran competentes. Este factor se aisló por primera vez de Streptococcus hemolítico grupo H pero también ha sido descrito en Pneumococcus (24), Bacillus cereus (25) y en Bacillus subtilis (26). Sus características indican que puede tratarse de una proteína ya que puede precipitarse con sulfato de amonio (70%) (27) y su actividad biológica es destruída por tripsina, pero no con DNasa, ribonucleasa, lipasa o lisozima (28).

Por otro lado existen sistemas en los cuales la fase de competencia es obviada al usar como células receptoras a protoplastos (células carentes de pared celular). Esto se logra con un tratamiento de lisozima y en soluciones hipertónicas como sacarosa en altas concentraciones. De cualquier manera los resultados que se obtienen con este sistema son muy bajos tal vez debido a la fragilidad de los protoplastos. Otro mecanismo es el tratamiento con soluciones de CaCl_2 (45 y 46) y la transfección de E. coli K_{12} por DNA de fago gracias a "un fago ayudador". (29).

II. PENETRACION DEL DNA.

Unos cuantos minutos después de que el DNA transformante ha estado en contacto con bacterias competentes, se vuelve insensible a - - inactivación por medio de deoxiribonucleasa adicionada al medio y por esta razón se dice que ha entrado a las células o que ha sido incorporado (23 y 30).

Algunos factores que afectan a la penetración son:

1).- El medio en el cual se ponen en contacto las células y el DNA. Estos medios no necesariamente permiten el crecimiento bacteriano.- Un ejemplo concreto lo tenemos con E. coli K₁₂, la cual se pone en contacto con el DNA en altas concentraciones de CaCl₂.

2).- Tamaño de DNA.- La penetración también va a ser función - del tamaño del DNA usado en la transformación. En el caso de Hemophilus el tamaño óptimo resulta ser de 15×10^6 d., en Neumococo ha sido estimado en 5×10^6 d. y en E. coli en un rango que oscila entre 10 y 30 millones de daltones (31).

3).- La estructura secundaria (doble hélice) ya que en todos o en casi todos los casos el DNA transformante debe de ser de doble hélice y el desnaturalizado no presenta ninguna actividad a menos que sea previamente renaturalizado (32). Se tiene también noticia de transformación con híbridos de DNA-RNA (33) así como de RNA total en neumococo (34) y - en Neurospora crassa (35). La razón del requerimiento de doble hélice podría ser la degradación del DNA de hélice sencilla por la acción de nucleasas antes de que pueda ser integrado. (36)

4).- Presencia de sitios receptores en la membrana. Este hecho se ve apoyado por experimentos de inhibición de la penetración del DNA - homólogo marcado con P³² por competencia de DNA de timo de ternera o de E. coli. en sistemas como Hemophilus y B. subtilis (19). Los datos obtenidos a la fecha sugieren que no existe especificidad de penetración del DNA dependiendo de su origen ya que el DNA de E. coli penetra con la misma eficiencia que el DNA homoespecífico en Pneumococcus. En este punto - surge la inquietud de saber el porqué el DNA de E. coli a pesar de penetrar no es un DNA transformante. Un poco mas adelante trataremos de dar una explicación a esto en base a datos de la literatura y a los obtenidos en este trabajo.

RESTRICCIÓN Y MODIFICACION:

Los fenómenos de la restricción y modificación fueron comprendidos en E. coli K₁₂, gracias a la investigación de Arber y Dussoix entre otros investigadores. (37)

Muchas cepas de E. coli pueden reconocer y degradar DNA proveniente de otras cepas de E. coli o de otros microorganismos. El hecho de que una molécula de DNA extraño sea degradado depende de las características, de carácter no heredable, impartidas a ella por la célula de la cual se obtuvo. A esto se le conoce como modificación controlada por el huésped. Por ejemplo, el resultado de tratar de infectar a E. coli cepa K con fagos Lambda depende del huésped en el cual los bacteriofagos fueron crecidos en el ciclo anterior. Los obtenidos a partir de una bacteria que poseía el carácter de modificación m_K se multiplican en E. coli K -- con alta eficiencia, pero la infección con bacteriofagos Lambda crecidos en otros huéspedes resulta abortiva. Aparentemente el DNA no modificado por un sistema m_K es degradado inmediatamente al entrar. Arber y Dussoix observaron que el DNA no modificado del bacteriofago Lambda marcado con fósforo 32, sufría un rompimiento muy extenso en los primeros minutos -- después de su penetración en un huésped restrictivo, dando lugar a fragmentos que iban desde fosfatos inorgánicos hasta oligonucleótidos. El rompimiento parece que se lleva a cabo en dos etapas:

1).- Primero un rompimiento endonucleolítico realizado por la enzima de restricción de la bacteria infectada, originando fragmentos -- grandes.

2).- Un segundo paso de carácter inespecífico, más lento llevado a cabo por enzimas encargadas de la degradación del DNA, así como de otras que se sabe participan en eventos de recombinación (exonucleasa V y exonucleasa I).

Puesto que tanto el DNA de fagos como el bacteriano, transferedo entre células por conjugación o transducción, está sujeto a modifica-

ción y restricción, se sugiere que este fenómeno juega un papel importante tanto en el mantenimiento de la identidad de una cepa como en la regulación de la información genética entre bacterias.

MODIFICACION:

Existen evidencias de que este caracter de modificación de una molécula de DNA está determinado por un patrón específico de glucosilación o metilación (33). La hipótesis mas sencilla desde el punto de vista bioquímico que se puede elaborar, es que cada alelo de restricción, -- que codifica para la formación de una nucleasa específica para el DNA, -- no posea el correspondiente patrón de glucosilación o de metilación.

Meselson y Yuan (39) en 1968 purificaron y caracterizaron la enzima de restricción de E. coli K₁₂, una endonucleasa presente solo en las cepas K que usa como cofactores al ATP y a la S- Adenosil metionina y Mg⁺⁺. Esta enzima es sumamente activa contra todo tipo de DNA que pro venga de cepas que no posean el alelo m_K.

TRANSFORMACION EN Escherichia coli K₁₂.

En general hasta principios de 1972 se consideraba a E. coli como una bacteria no transformable por su propio DNA cromosomal. Hasta antes de esta fecha habían sido publicados algunos reportes en donde se creía haber transformado a E. coli K₁₂ pero estos resultaban mas bien dudosos (40). Por otro lado ya se sabía para esta fecha que era posible la penetración de DNA viral en E. coli con la ayuda de partículas fágicas defectuosas (41) y (29).

En 1970 hubo reportes en donde demostraban la penetración e infectividad de algunos DNAs de fagos como T₁, T₄, T₅ y P₂₂ con ayuda de sulfato de protamina y usando como receptor a esferoplastos (células tratadas con lisozima para quitar la pared celular) (42). En ese mismo año Mandel y Higa desarrollaron un sistema de transfección en donde se alcan

zaba la competencia por medio de soluciones de alta concentración de iones Ca^{++} (43) y (44). Usando este método para producir competencia de -- las células, Oishi y Cosloy (45) así como Wackernagel (46) demostraron -- la transformación (ingreso y expresión fenotípica del DNA del donador en la cepa receptora) en E. coli K_{12} con DNA cromosomal linear.

BASES GENÉTICAS DE LA TRANSFORMACION EN E. coli K_{12} .

Para que este fenómeno se lleve a cabo es muy importante que el genotipo de la célula receptora sea del tipo $\text{recB}^- \text{recC}^- \text{sbcB}^-$ o $\text{recB}^- \text{recC}^- \text{sbcA}$. Estas cepas muestran la frecuencia de transformación mas alta mientras que una cepa $\text{recB}^+ \text{recC}^+ \text{sbcB}$ y una cepa $\text{recB}^+ \text{recC}^+ \text{sbcB}^+$ -- producen el 20% y el 1% del número máximo de transformantes respectivamente (47).

Entre las mutaciones que causan una disminución considerable -- en la frecuencia de recombinación en E. coli K_{12} silvestre ("Wild type"), está el grupo situado entre *thyA* y *arg A* (alrededor de minuto 54 del cromosoma de E. coli K_{12} (ver figura 3). En esta región se conocen cerca de 36 alelos de los cuales los primeros 20 caen dentro de los llamados *recB* y *recC*. (48). Todas estas mutaciones tienen en común que inactivan una -- nucleasa que se ha denominado exonucleasa V. Esta enzima es una exonuclea -- sa cuya actividad depende de ATP y que degrada tanto DNA de doble hélice -- como de hélice sencilla progresivamente hasta oligonucleótidos. La ac -- ción sobre DNA de doble hélice parece ocurrir en las direcciones 3' a 5' -- y de 5' a 3' simultáneamente, no habiendo preferencia por el extremo 3' -- ó 5' del DNA de hélice sencilla. No degrada DNA circular de doble hélice -- y además hidroliza ATP en presencia de DNA a pesar de no haber degrada -- ción.

Todas las propiedades antes mencionadas así como también la -- drástica reducción en la frecuencia de recombinación y una marcada sensi -- bilidad a luz ultravioleta, están ausentes cuando hay una mutación en -- cualquier de los genes *recB* o *recC* (49 y 50).

Clark y colaboradores (51) descubrieron dos clases de mutaciones supresoras indirectas de las mutaciones *recB* y de *recC*. Estas mutaciones indirectas fueron designadas como *sbcA* y *sbcB* y restauran la capacidad de recombinar de las cepas con mutaciones en *recB* y en *recC* a un nivel normal sin que vuelva la actividad enzimática dependiente de ATP (exonucleasa V). El producto de gene *sbcB* fué identificado mas tarde como la exonucleasa I (51).

Aparentemente tanto la ausencia de la exonucleasa V como la de exonucleasa I desenmascaran un nuevo camino o vía de recombinación genética que se denomina la vía *recF*.

En el caso de las mutantes *sbcA* aparece un nuevo tipo de actividad de DNasa cuya actividad es independiente de ATP.(52). Esta cepa parece ser transformable aunque no con una frecuencia menor que la $recB^- - recC^- sbcB^-$. No se sabe mucho acerca del mecanismo de acción de esta enzima ATP independiente, lo que sí parece estar claro es que no degrada al DNA entrante sino que mas bien participa como un componente de una vía de recombinación denominada *recE* por Clark et al.

Las únicas mutaciones supresoras indirectas que se conocen de *recB* y *recC* son *sbcB* y *sbcA*, sin embargo también se podría realizar al crear lo que se conoce como una condición rac^+ ("activación de la recombinación") en cepas mutantes $recB^-$ o $recC^-$. Por ejemplo en la introducción del gene *rac* de una cepa donadora Hfr rac^+ a una $F^-(recB^- \text{ o } recC^-)$ puede producir un estado intracelular transitorio favorable para que se lleve a cabo la transformación.

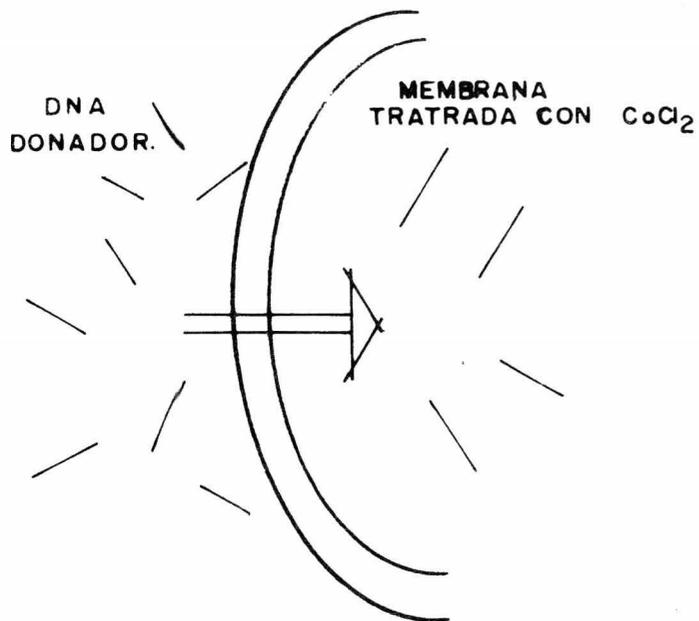
Un aspecto interesante de la transformación genética en *E. coli* K_{12} es una comparación con la transducción mediada por el bacteriofago P_1 , la cual se lleva a cabo como ya se dijo antes por medio de fragmentos de DNA cromosomal envueltos en una cápside fágica. El mecanismo básico tanto en la transducción como en la transformación parece ser si-

milar en el sentido de que ambos sistemas usan como fuente de información genética fragmentos de DNA relativamente pequeños. Sin embargo la acción inhibitoria de la transformación por medio de la exonucleasa V no tiene paralelo en la transformación ya que de alguna manera estos fragmentos son protegidos de la degradación, a pesar de que la enzima los use como sustrato ya que hay recombinación genética.

Como recapitulación podríamos decir que los factores principales responsables de la transformabilidad de E. coli K₁₂ son entre otros la competencia, la cual se alcanza gracias a soluciones de iones de Ca⁺⁺ que causan que sea posible la penetración de las moléculas de DNA y la ausencia de una exonucleasa capaz de degradar DNA lineal y además la presencia en estas mismas cepas de una mutación supresora la cual ocasiona una recuperación de la capacidad de recombinación. Ver figura 4.

EXONUCLEASA V ó DNASA ATP DEPENDIENTE.

DIAGRAMA .



$\frac{\text{rec. E}}{\text{rec B}^- \text{rec C}^- \text{sbc A}^-}$ TRANSFORMACION.

$\frac{\text{rec. F}}{\text{rec B}^- \text{rec C}^- \text{sbc B}^-}$ TRANSFORMACION.

$\frac{\text{rec BC (ATP-DNSA)}}{(\text{rec B}^+ \text{rec C}^+)}$ DEGRADACION.

Fig. 4.- Factores responsables de la transformabilidad de E. coli K₁₂

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

CEPAS BACTERIANAS:

Cepa	Sexo	Genotipo	Derivación	Fuente.
JM 250	F ⁻	recB ⁻ recC ⁻ sbcB leu ⁻ , treo ⁻ , his ⁻ , arg ⁻ , pro ⁻ , ara ⁻ , xil ⁻ , gal ⁻ , mtl, lac ⁻ , sup E, Sm ^R .	JC 7623	A. J. Clark
JM 251	F ⁻	reB recC sbcB leu ⁻ , treo ⁻ his ⁻ , arg ⁺ , pro ⁻ ara ⁻ xil ⁻ , gal ⁻ , mtl, lac ⁻ , sup, E. Sm ^R .	JM 250 (Transforma - ción.)	Este Laboratorio.
JM 252	F ⁻	JM 251 Mu ⁺ .	JM 251 Mu lisogénica.	Este Laboratorio.
JM 253	F ⁻	recB recC sbcB leu ⁺ , treo ⁻ , his ⁻ pro ⁻ , pirA ⁻ (Mu), ara ⁻ , xil ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , lac ⁻ , Sm ^R , sup E.	JM 252 X JM 59	Este Lab.

JM 254	F ⁻	recB recC abcB leu ⁺ , treo ⁻ , his ⁻ , pro ⁻ , arg ⁻ , ara ⁻ , xil ⁻ , gal ⁻ , lac ⁻ , mtl ⁻ , Sm ^R , sup, E.	JM 250 (Transforma - ción).	Este Laboratorio.
JM 255	Hfr	treo ⁻ , gal ⁻ , λ ⁺ , hsr ⁻ , hsm ⁺ .	HB 94 (Hfr Hayes)	Herbert Boyer
JM 256	Hfr	Treo ⁻ , gal ⁻ , λ ⁺ , hsr ⁻ , hsm ⁻ .	HB 155 (Hfr Hayes)	Herbert Boyer
JM 257	F ⁻	JM 250/R(Tc, Sm, Cm, Su, Km).	JM 250 (Transforma - ción con DNA JM 104)	Este Laboratorio.
JM 258	F ⁻	recB recC sbcB treo ⁺ , Δ ara leu, his ⁻ , arg ⁻ , pro ⁻ , xil ⁻ , gal ⁻ , lac ⁻ , mtl ⁻ , Sm ^R , sup E.	Transducción. P ₁ vir 337 en rio. JM 254.	Este Laboratorio.
JM 259	F ⁻	reB recB sbcB treo ⁺ , leu ⁻ , arg ⁻ , his ⁻ , pro ⁻ , ara ⁻ , gal ⁻ , lac ⁻ , xil ⁻ , mtl ⁻ , Sm ^R , sup. E. hsr ⁻ , hsm ⁺ .	JM 255 X JM 250	Este Lab.
JM 260	F ⁻	recB recC sbcB treo ⁺ , Δ ara leu, arg ⁻ , his ⁻ , pro ⁺ , gal ⁻ , lac ⁻ , xil ⁻ , mtl ⁻ , Sm ^R , sup. E. hsr ⁻ , hsm ⁺ .	JM 255 X JM 258	Este Lab.

JM 261	F ⁻	recB recC abcA gal ⁻ , Endo I ⁻ .	JC 5183	A. J. Clark
JM 262	F ⁻	recB recC sbcB Δ ara leu, leu ⁺ , ara ⁺ , his ⁻ , pro ⁻ , treo ⁺ , gal ⁻ , lac ⁻ , xil ⁻ , mtl ⁻ , Sm ^R , sup. E.	JM 250 (Transformación)	Este Lab.
JM 263	F ⁻	recB recC sbcB, pyrA ⁻ (Mu-1), treo ⁺ , leu ⁻ , his ⁻ , pro ⁺ , arg ⁺ , ara ⁻ , lac ⁻ , xil ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , Sm ^R , sup. E. hsr ⁻ , hsm ⁺ .	P ₁ vir ²⁵⁹ en - JM 253	Este Lab.
JM 264	F ⁻	JM 250 xil ⁺ .	JM 250 (Transformación)	Este Lab.
JM 265	F ⁻	recB recC sbcB pyrA ⁺ , treo ⁺ , leu ⁻ , his ⁻ , arg ⁺ , ara ⁻ , lac ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , xil ⁻ , Sm ^R , sup. E, hsr ⁻ , hsm ⁺ , Mu-1 ⁻ .	JM 263 Transformación DNA de JM 1004.	Este Lab.
JM 266	F ⁻	recB recC sbcB, pyrA ⁺ , treo ⁺ , pro ⁺ , leu ⁻ , his ⁻ , arg ⁺ , ara ⁻ , lac ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , xil ⁻ , Sm ^R , sup. E, hsr ⁻ , hsm ⁺ , Mu-1 ⁻ .	JM 263 Transformación DNA de JM 261.	Este Lab.

JM 267	F ⁻	recB recC sbcB pyrA ⁻ , (Mu-1), treo ⁺ , pro ⁺ , arg ⁺ , his ⁻ , leu ⁻ , ara ⁺ , gal ⁻ , xil ⁻ , mtl ⁻ , lac ⁻ , Sm ^R , sup. E. hsr ⁻ , hsm ⁺ .	P ₁ vir ⁵¹ en JM 263 Este Lab.	
JM 1	Hfr	E. coli K ₁₂ protō- trofa.		Hayes
JM 51	F ⁺	ara ⁻ , B ₁ ⁻ .		A. Taylor
JM 55	F ⁺	treo ⁻ , ara ⁻ , pyrA ⁻ , Sm ^R , Mu-1 ⁺ .		A. Taylor
JM 59	F ⁺	treo ⁺ , leu ⁺ , ara ⁻ (Mu-1) pyrA ⁻ , (Mu-1), SM ^S , B ₁ ⁻ , pdx-1 (Mu-1).		A. Taylor
JM 337	F ⁺	B ₁ ⁻ . (ara, leu); (lac)		Cold Spring Harbor 1973.
JM 230	F ⁺	Sm ^S , B ₁ ⁻ , P ₁ cm ⁺ .	JM 11 inf. P ₁ cm.	Este Lab.
JM 1004		<u>Salmonella typhi</u>		
JM 1005		<u>Salmonella typhi</u> ara ⁻ .	Mutación NTG	Este Lab.
JM 241	F ⁻	<u>E. coli B.</u> prote- trofa.		
JM 242	F ⁻	<u>E. coli B.</u> ⁺ .	Infec. con a JM 241	Esta Lab.
JM 244	F ⁻	<u>E. coli B.</u> P ₁ cm ⁺ .	Infec. con P ₁ cm a JM 241	Este Lab.
JM 104	R ⁺	treo ⁻ , leu ⁻ , lac ⁻ , T ₁ ^R , T ₆ ^S , Su ^R , Cm ^R , Tc ^R , fi ⁺ .	A T 736	A. Taylor.

NOMENCLATURA DE ACUERDO CON A. TAYLOR.

treo	=	treonina
leu	=	leucina
pirA	=	pirimidina A(gene estructural de la carbamil fosfato sintetasa)
pdx	=	piridoxina B
pro	=	prolina
met	=	metionina
his	=	histidina
trip	=	triptofono
arg	=	arginina
thy	=	timina
cys	=	cisteína
lac	=	lactosa; utilización de ..
gal	=	galactosa; utilización de ..
ara	=	arabinosa; utilización de ..
mtl	=	manitol; utilización de ..
Sm ^S	=	sensibilidad a estreptomycin
Sm ^R	=	resistencia a "
pirA ⁻ (Mu-1)	=	mutación producida por la integración del profago Mu-1 en - el <u>locus</u> pirA.
Hfr	=	Alta frecuencia de recombinación
F ⁺	=	células donadoras del factor F
F ⁻	=	células receptoras o hembras
P ₁ cm	=	Mutante del fago P ₁ cuyo represor es termosensible y además <u>con</u> tiene el gene responsable de la resistencia a cloranfenicol.
DNAsa	=	Deoxiribonucleasa.
ENAsa	=	Ribonucleasa
UK	=	unidades Klett Summerson

CEPAS DE BACTERIOFAGOS.

1).- FAGO LAMBDA.- Se obtuvo por inducción de éste por medio de un antibiótico que inhibe la replicación del DNA como es la mitomicina a partir de una cepa lisogénica para este fago (JM 100).

2).- FAGO P₁vir.- Se propagó sobre una cepa silvestre (wild - - type), obteniéndose un título de 5×10^9 fagos/ml.

3).- FAGO Mu-1.- Se obtuvo por crecimiento de la cepa JM 146 - - posteriormente se recolectó el fago que se indujo espontáneamente y a -- continuación se propagó sobre la cepa JM 1, obteniéndose crecimiento con fluente con título entre $5-8 \times 10^9$ fagos por mililitro.

4).- FAGO P₁Cm.- El fago P₁Cm es un fago cuyo represor es sensible a la temperatura (42°C). Se obtuvo por inducción con temperatura de la cepa JM 230.

MEDIOS DE CULTIVO(Cantidades por litro de H₂O desionizada).

1).- MEDIO COMPLETO (Medio Luria).-Bactotripton (Difco) 10g, Extracto de levadura (Difco) 5g, NaCl 10 g, Timina (Sigma Chemical Co.) -- 30 mg, Se ajusta el pH a 7 con NaOH.

2).- MEDIO MINIMO.- Na₂HPO₄ 6g, KH₂PO₄ 5.3 g., (NH₄)₂SO₄ 2g., - MgSO₄ 2ml, de solución al 10%, Ca(NO₃)₂ 1 ml. de solución al 1%, FeSO₄ 1 ml. de sol al 0.05%. La fuente de carbono, que generalmente es glucosa, - se adiciona a razón de 1 ml. de solución al 20% por cada 100 ml. de me--dio. Cuando se use algún otro azúcar como fuente de carbono, se adiciona igual cantidad que la anterior. Los requerimientos específicos para cada cepa se agregan a una concentración final de 100 microgramos/ml, vitamina B₁ 0.1 ml/100 ml. de medio preparado. Cuando se desee trabajar con medio sólido se adiciona agar-agar (Difco) a una concentración final del - 2%.

3).- MEDIO P.- Consiste en : Fosfato de potasio 0.02M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.015 M., MgSO_4 0.001M., FeSO_4 1.8×10^{-6} M. Se ajusta el pH a 7 con potasa. Glucosa 0.2%. Los aminoácidos requeridos se adicionan a una concentración final de 100 microgramos/ml y vitamina B₁ a 10 microgramos/ml.

Las cajas de Medio P selectivas para transformación contienen: K_2HPO_4 10.5 g, KH_2PO_4 4.3 g, Na_3 Citrato $3\text{H}_2\text{O}$ 0.47 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, - - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, agar-agar (Difco) al 1.5%. Este medio va suplementado con glucosa al 0.2% como fuente de carbono, los aminoácidos requeridos y la vitamina B₁ se adicionan a una concentración final de 50 y 5 microgramos/ml, respectivamente.

4).- MEDIO COMMINGS (para inducción del fago lambda).

Este medio ha sido diseñado especialmente para inducir al fago-lambda por medio de mitomicina. Contiene:

Na_2HPO_4 6g, KH_2PO_4 3g, NH_4Cl 2g, Na_2SO_4 2.1 g, MgSO_4 0.001 M, FeCl_3 2×10^{-6} M. Glucosa 1%, B₁ 50 microgramos/ml.

5).- MEDIO MACCONKEY.- Este medio está diseñado para la selección de mutantes de azúcares. Las colonias capaces de fermentar un determinado azúcar aparecen de color rojo, de lo contrario son de color blanco. Se prepara de la siguiente manera: 40g, de Mac Conkey agar-Base (Difco)-por litro de medio. El azúcar seleccionado se adiciona a razón de 10 g.-por litro de medio preparado.

REACTIVOS:

Deoxiribonucleasa pancreática, Worthington Biochemical Corporation.

Ribonucleasa pancreática, Worthington Biochemical Corporation.
Mitomicina C. de Streptomyces caespitosus, cristalina, Sigma - Chemical Co.

Lisozima, Worthington Biochemical Corporation.

Pronasa grado B, Calbiochem.

Ampicilina, Pentrexyl. Laboratorios Bristol.

Sulfato de Estreptomina, Sigma Chemical Co.

Bicarbonato sodio C¹⁴ 0.25 mCi/2.5 mg, New England Nuclear.

Sulfato de amonio (Especial grado enzima, ULTRAPUTO) Schwarz/Mann.

Sephadex G-25, Pharmacia Fine Chemicals.

Fenol, Baker Chemical Co. (Se destiló dos veces antes de usarse y se guardó congelado a -20°C).

Dowex IX-8 400, Sigma Chemical Co.

Mezcla de Centelleo para muestras acuosas (Bray): Naftaleno 6g, PPO 0.4g, POPOP 0.02g, Metanol 10 ml, etilenglicol 2 ml, dioxano, todas las cantidades anteriores se aforan a 100 ml con dioxano.

Todos los aminoácidos son de Sigma Chemical Corporation.

La glucosa empleada fué de Difco y todos los demás azúcares en cambio son de Sigma Chemical Co.

PROTOCOLO DE UNA TRANSDUCCION MEDIADA POR EL BACTERIOFAGO P₁vir.I. Propagación del fago P₁vir.

- a) Crecer la cepa donadora a una concentración de 1×10^9 células por ml.
- b). Diluir el "stock" del fago a 5×10^6 fagos/ml. en medio Luria.
- c). Fundir 4-5 tubos de agar al 0.5% de medio completo y agregar a cada tubo 0.05 ml. de CaCl₂ 0.25 M. estéril.
- d). Trabajando con un tubo a la vez, agregar 0.1 ml. de cultivo a la cepa donadora y 0.1 ml, de la dilución del fago.
- e). Platear 4-5 cajas de medio completo-agar al 1% con CaCl₂ - 0.25 M. (1 ml., por cada 100 ml).
- f). Incubar las cajas durante 4-5 horas a 37°C.
- g). Agregar a cada caja 2.5 ml. de medio completo e incubar 90 minutos mas a 37°C.
- h). Tomar el líquido sobrenadante y centrifugar a 2 500 rpm.,- en tubos que contengan 0.5 ml. de CHCl₃ (evitar el crecimiento bacteriano).
- i). Recoger el sobrenadante y agregar 1 ml., de CHCl₃. Guardar a 4°C.
- j). Titular el fago sobre una cepa sensible (JM1).

II. Transducción.

- 1). Crecer 5 ml. de la célula receptora hasta $1-2 \times 10^9$ células--

las por mililitro.

2). Centrifugar a 3 000 rpm. durante 10 min. y resuspender las células en 1 ml. de solución salina (NaCl-0.85%). Añadir 0.1 ml. de CaCl₂ -- (0.25M).

3). Colocar en 4.5 ml. de medio completo 0.5 ml de suspensión de células y 0.1 ml. de dilución de fago profagado sobre la cepa donadora - (Generalmente se usa una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5) y 0.1 ml. de CaCl₂ (0.25 M).

4). Repetir la operación anterior con el 0.5 ml de células restantes, solo que esta vez sin adicionar fagos con el objeto de tener un control que nos indique un rango de reversión espontánea de la cepa receptora.

5). Dejar las mezclas sin agitación por 30 min. a 37°C.

6). Transcurrido este tiempo someter la mezcla a agitación vigorosa por 30 segundos en un vortex.

7). Centrifugar a 2 500 rpm. por 10 min. y resuspender las células en 1 ml de solución salina.

8). Platear las siguientes diluciones de la mezcla: 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², en cajas de medio selectivo.

9). Incubar a 37°C. por 24-36 hrs y tomar recombinantes.

Usar el método de "replica plating" para encontrar la cepa buscada.

PROTOCOLO DE UNA CONJUGACION

1. Crecer la celular donadora (Hfr o F⁺) a una concentración de 1 X 10⁹ cel./ml.

2). Crecer la célula receptora (F⁻) a la misma concentración.

3). Colocar 0.5 ml. de células donadoras y 1 ml de receptoras - en matraces de 125 ml. que contengan 10 ml de medio completo cada uno.

4). Crecerlas con agitación moderada (con especial atención en la cepa macho ya que una agitación violenta puede romper el pili) hasta una concentración de 35 uk. el macho y 45 u.k. la hembra.

5). Mezclar 0.5 ml. de la donadora con 4.5 ml de la receptora.

6). Incubar en baño de agua a 37°C. sin agitación durante el -- tiempo adecuado.

7). Al término de este tiempo agitar las bacterias por 1 min. - con el objeto de romper los puentes citoplasmáticos.

8). Centrifugar a 2 500 rpm. por 10 min. y resuspender en 1 ml. de solución salina.

9). Platear las siguientes diluciones, 10^0 , 10^{-1} en medio selectivo.

10). Control. Platear células receptoras y donadoras en los medios selectivos.

AISLAMIENTO DE DNA TRANSFORMANTE DE E. coli K₁₂

Se creció la cepa JM 261 (Endo I⁻) en medio completo, enfriada a 4°C. y cosechada en la fase logarítmica tardía o principios de la fase estacionaria (aprox. 100 u.k.) por medio de centrifugación a 3 000 rpm. por 10 - min. a 4°C. Se resuspendieron en 1/20 de su volumen original en una solución fría de NaCl (0.1 M.)-EDTA (0.1M) pH=8.5. Se adicionó Pronasa (Calbiochem -- grado B), 10 mg/ml., en SSC. 0.1X, previamente digerida por 4 horas a 37°C.- (con el objeto de eliminar posibles nucleasas contaminantes) para dar una -- concentración final de 500 microgramos/ml. (En algunas cepas se encontró que es conveniente la adición de lisozima a una concentración final de 10 microgramos/ml. ya que este tratamiento acorta mucho el tiempo en que se lleva a

cabo la lisis). Seguido de la adición de Dodecil Sulfato de sodio (10% en Buffer Tris-HCl 1 M. pH=9) para dar una concentración final de 1% y 0.1M. -- respectivamente. Después de incubar a 37°C. por 30 min., se adicionó igual volumen de una mezcla de fenol (recientemente bidestilado)-CHCl₃ preparada inmediatamente antes de usarse. Se agita vigorosamente por 5 segundos hasta volver homogénea la mezcla, a continuación se continúa la agitación muy suave por 20 min., a temperatura ambiente. Se centrifugó la emulsión en una centrífuga Sorvall automática MS₂ con un rotor de columpio por 10 minutos a 10 000 rpm. Se extrajo la fase acuosa (superior) la cual volvió a ser extraída dos veces más sólo que estas dos últimas, se adicionó igual volumen de una mezcla de CHCl₃ alcohol isoamílico (24:1) y agitando suavemente por 20 minutos. La fase acuosa fue precipitada con etanol absoluto (2 volúmenes marca Merck grado espectro) frío (-20°C.), dejando escurrir suavemente el etanol por las paredes del vaso de precipitados. El DNA crudo se recogió por medio de una varilla de vidrio al mezclar las dos fases. Una vez sacado todo, se secó por medio de una corriente de N₂ para eliminar el etanol remanente.

Posteriormente se disuelve el DNA en 1/20 de su volumen original de SSC 0.1 X (15 mM. NaCl - 1.5 mM. Na₃ Citrato) que contenía 5 mM. EDTA. -- Cuando estuvo completamente disuelto se adicionó 1/10 de su volumen de una solución de SSC 10 X (1.5 M. NaCl-0.15M. Na₃ Citrato) y RNAsa pancreatica -- (RNAsa A cristalina Worthington Biochem. Co.) 2 mg./ml. precalentada a 90°C. X 10 min. en 0.1M NaCl-0.01M. Buffer acetato pH = 5.2 a una concentración final de 25 microgramos/ml. Se incuba la mezcla por 30 min. a 37°C., adicionando al término de este tiempo la cantidad necesaria de una solución Tris - HCl (pH=9) para dar una concentración final de 0.1 M. Se extrae dos veces más con cloroformo-isoamílico tomándose en cada caso la fase acuosa. Se precipitó con etanol (2 vol.) y se resuspendió en un volumen apropiado de SS -- 0.1X para tener una concentración de 100-400 microgramos/ml. Se dializa -- exhaustivamente contra SSC 0.1 X por 24 horas a 4°C. y se guarda a la misma temperatura con una gota de cloroformo en el fondo del tubo.

Para la obtención de DNA de diferentes fuentes se siguió básicamente el método anterior salvo pequeñas modificaciones en lo que respecta a la manera de lisar las células, así por ejemplo en el caso de B. subtilis es necesario adicionar lisozima a una concentración de 50 microgramos/ml. e incubar por 15 minutos a 37°C. antes de adicionar pronasa y detergente con el objeto de alcanzar una lisis confluyente. En el caso de Streptomyces phaeocromogenes se adicionó una mayor cantidad tanto de pronasa (25 mg/ml.) como de lisozima (2 mg./ml.) y dejándose actuar por 45 minutos a 37°C., antes de la adición del detergente. Por lo que respecta a Neurospora crassa, después de recolectarse el micelio, se congeló y maceró con hielo seco en un mortero y después se homogenizó en presencia de detergente, adicionando a continuación igual volumen de fenol recientemente bidestilado y prosiguiendo la extracción como antes se mencionó.

ROMPIMIENTO DEL DNA.

Denominamos DNA entero al DNA que no ha sido sometido a ningún tratamiento para romperlo. Según datos de Cosloy y Oishi así como de Wacker nagel, el peso molecular promedio de este DNA oscila entre 30-300 millones de daltones. Si el DNA es pasado 5 veces por una aguja del No. 22 se obtiene un peso molecular promedio de 15-40 millones de daltones. Un peso de --- aproximadamente 10 millones se alcanza con 5 pasadas por una aguja del No. - 22 y 3 por una del 27. (46).

PROTOCOLO DE UNA TRANSFORMACION

Toda manipulación salvo en donde se indique otra condición, se realiza entre 0°-4°C. Se crecen 10 ml de la cepa receptora en medio P con requerimientos durante toda la noche con agitación y son usados para inocular 200 ml de medio fresco y precalentado a 37°C. Estas células son crecidas con agitación hasta 80 unidades Klett Summerson, en este punto se enfría el cultivo, se centrifugá a 3 000 rpm a 4°C durante 10 min. Se lavan las células (100 ml) con CaCl₂ 10 mM y se resuspenden en CaCl₂ 30 mM, (100 ml). Después de haberse incubado a 0°C por 20 minutos se centrifugan y resuspenden -

en CaCl_2 30 mM (5 ml). Una porción de la suspensión de células (0.3 ml) se transfiere a tubos que contienen DNA (0.1 ml) y CaCl_2 60 mM (0.1 ml). Se incubaba la mezcla de reacción por 60 minutos a 0°C y la reacción es terminada por la adición de DNAsa pancreática a una concentración final de 1 microgramo/ml (50 microlitros de una solución de DNAsa a una concentración final de 20 microgramos/ml en 0.01M Tris-HCl 0.001 M CaCl_2 , pH = 7.6). Se platearon 0.3 ml de mezcla por caja. Las transformantes aparecen después de 36-48 h. de incubación a 37°C . Se usaron cajas de medio completo para contar el número total de células viables en la mezcla de transformación.

INDUCCION DEL BACTERIOFAGO LAMBDA POR MEDIO DE MITOMICINA

Se crece la cepa lisogénica en medio Cummings hasta 60 unidades-Klett Summerson. En este momento se adiciona mitomicina disuelta en un poco de H_2O estéril a una conc. final de 2 microgramos/ml. Se adiciona también en ese momento triptona al 5% a razón de 10 ml. por cada 100 ml de cultivo con el objeto de proporcionar los aminoácidos suficientes para la producción de proteína que va a formar parte de la cápside viral. La lisis ocurre aproximadamente entre 2-2.30 horas después de la inducción. Una vez que se observa lisis total, se adiciona 1 ml. de cloroformo y se enfría el medio de cultivo con el objeto de evitar crecimiento bacteriano y con esto la pérdida de fago por adsorción en estas células. Rápidamente se centrifuga el lisado a 3 000 rpm. quedando el fago en el sobrenadante. Se puede guardar a 0° - 4°C . con un poco de cloroformo. Se titula sobre una cepa sensible.

CURACION DE UN FACTOR EPISOMAL POR MEDIO DE ANARANJADO DE ACRIDINA Y DE RAMPICINA.

Naranja de Acridina.

Se crecen las células en medio completo durante toda la noche -- aproximadamente a 1×10^9 cel./ml. Se diluyen hasta 5×10^7 cel./ml. en medio Luria. Se toman 0.1 ml de esta dilución y se adicionan a 10 ml. de Luria ajustado a un pH = 7.8 con sosa. El colorante se adiciona a una concen

tración final de 40 microgramos/ml. Se cubre el título de ensayo con papel estaño ya que estas sustancias son sensibles a la luz y se incuban -- por 24 horas a 37°C. Al término de este tiempo se aíslan colonias por el método de estrías y se determina el porcentaje de curación por medio de método de réplica.

Rifampina.

La curación de un factor episomal por medio de un antibiótico -- como la rifampicina (inhibe transcripción); es básicamente la misma operación arriba descrita solo que en este caso no se usa medio Luria a pH= 7.8 sino neutro y la concentración del antibiótico no debe exceder de 5 -- microgramos por mililitro ya que éste resulta ser sumamente tóxico para las células a mayor concentración.

DETECCION DE UNA CEPA CARENTE DE RESTRICCIÓN (hsr^-).

Con el objeto de determinar si una cepa es capaz de restringir-DNA proveniente de una cepa no homóloga se montó la siguiente técnica:

Se usaron dos indicadores que son el fago lambda y el fago P₁-Cm. (temperatura sensible). En el primer caso se propagó en una cepa E. coli K₁₂ (JM 1) lográndose de esta manera que tenga la modificación específica de E. coli K₁₂, así como también en una cepa E. coli B. En este último caso surgió el problema de que el tipo B presenta dificultad a la infección por lambda por lo cual se pensó introducirlo por medio de conjugación y puesto que la cepa donadora se buscó que fuese una cepa lisogénica y la receptora no lo es, se presenta un fenómeno denominado inducción zigótica, es decir que en el momento de entrar el segmento cromosomal que lleva insertado el profago, éste pasa a fase vegetativa ya que -- en la célula receptora no existe represor. La gran mayoría de estos fagos producidos por inducción zigótica van a ser degradados por el sistema de restricción de E. coli B. pero existe la posibilidad de que algunos de ellos sean modificados por la metilasa de modificación antes de --

ser alcanzados por los sistemas de restricción de esta cepa. Una vez encontrada una cepa lisogénica entre las sobrevivientes de la conjugación se crece y se induce por medio de mitomicina.

El fago P_1 cm se propagó en un medio sólido, como ya se describió antes, también tanto en una cepa tipo K como una tipo B.

La eficiencia de plateo (número de placas) de un fago lambda modificado por B es de cuatro órdenes de magnitud abajo que la eficiencia de plateo del fago con la modificación de K en E. coli K_{12} , siendo igual en el caso de una cepa que no posea mecanismos de restricción (hsr^-).

En el caso de P_1 cm la eficiencia de plateo oscila entre 1 a 2 órdenes de magnitud abajo para un fago crecido en la cepa tipo B con respecto a otro crecido en E. coli K_{12} al infectar una cepa tipo K y básicamente la misma cuando se trata de una cepa hsr^- .

SEMIPURIFICACION DE CARBAMIL FOSFATO SINTETASA

Se crecieron las cepas JM 263, JM 1004, JM 265 y JM 266 en medio mínimo con requerimientos. Se colectaron al llegar a 80 U.K. por medio de centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. y a 4°C. Se resuspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos, KH_2PO_4 0.05 M, pH= 7.5 y se sonicaron (sonicador tipo B-12 marca Bronson) hasta tener una lisis total teniendo cuidado de mantener la temperatura abajo de 7°C. Se centrifuga el lisado a 30,000 Xg. durante 15 minutos de 4°C y el sobrenadante se pasa por una columna de Sephadex G-25 (30 X 0.9 cm) previamente equilibrada con el mismo amortiguador. El lisado semi purificado de esta manera se guarda en fracciones pequeñas de 0.5 ml y en presencia de glicerol (10%) a -20°C.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE CARBAMIL FOSFATO SINTETASA RADIOISOTOPI-
CAMENTE.

La actividad de CPS se determinó por método de Anderson y Meis-
ter (53). Los extractos guardados a -28°C se descongelan en hielo, se dia-
lizan por una columna de Sephadex G-25 con el objeto de eliminar al gli-
cerol y se les determina cantidad de proteína por el método de Lowry. Se-
hacen las diluciones necesarias para tener los extractos a una misma con-
centración de proteína.

La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 1 ml: Amor-
tiguador de fosfatos (KH_2PO_4) $\text{pH}=7$, 100 micromolas; MgCl_2 , 12 micromolas;
ATP, 12 micromolas; KCl, 80 micromolas; glutamina, 10 micromolas; C^{14} - -
 NaHCO_3 , 15 micromolas, 500 000 cpm y el extracto de las cepas deseadas.

La mezcla se incubó a 37°C . por 10 min. en baño de agua, parándo-
se la reacción con 0.1 ml de una solución que contenía; NH_4OH 0.7N y KOH -
2.7 N (preparada inmediatamente antes de usarse). De esta manera el C^{14} -
carbamil fosfato formado se convierte cuantitativamente a C^{14} - cianato. -
Después de dejar reposar 10 min. adicionales a 37°C se convierte el C^{14} -
cianato en C^{14} -urea por medio de la adición de NH_4Cl 4M, $\text{pH} = 8.5$ (0.4ml),
seguida por un calentamiento a 100°C durante 10 minutos. A continuación -
se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos con el objeto de eliminar la-
proteína densaturalizada y se pasó una alícuota del sobrenadante por una-
columna de Dowex 1 X 8 400 en su forma OH^- (las columnas contenían 6 ml -
de resina lavada primero con HCl 1M y posteriormente neutralizada hasta -
un pH neutro con agua, lavada a continuación con NaOH 1 M y otra vez neu-
tralizada con H_2O desionizada. La resina así preparada está lista para --
ser usada como intercambiador iónico fuertemente básico). El principio de
este método se basa en la propiedad que esta resina tiene de retener el -
100% de bicarbonato C^{14} y permitir que el 90% de la urea sea eluída con -
agua. La elución de la urea se llevó a cabo con 10 ml de agua. Se tomó --
una alícuota de 50 microlitros, colocándola en un vial que contenía 10 ml.

de Bray (Mezcla de centelleo para muestras acuosas). La actividad del --
C¹⁴ presente se determinó en un espectrofotómetro de centelleo líquido -
marca Nuclear Chicago con una eficiencia del 80%.

R E S U L T A D O S

TRANSFORMACION DE LA CEPA E. coli K₁₂ recB recC sbcB QUE RESTRINGE DNA HETE
ROLOGO CON DNA LINEAR.

Cuando la cepa JM 250 de E. coli B₁₂ multiauxótrofa que no posee actividad de la exonucleasa V(recB recC) y de la exonucleasa I (sbcB) pero que retiene su capacidad de recombinar fue tratada con CaCl₂ y puesta en contacto con DNA lineal aislado de una cepa protótrofa (JIM 261) endoI⁻ se obtuvieron colonias transformantes en medio selectivo el cual no permitía el crecimiento de la cepa original. (Ver Tabla No. 1).

La frecuencia de reversión de la cepa JM 250, dependiendo del marcador de que se trate es de:

$$\text{ARG} = 2.9 \times 10^{-8}$$

$$\text{HIS} = 6.6 \times 10^{-9}$$

$$\text{LEU} = 5.5 \times 10^{-9}$$

Otro parámetro importante en transformación es el tamaño del DNA usado para transformar. Así por ejemplo en el caso de B. subtilis se ha demostrado que el tamaño mas apropiado cae en un rango de $1-10 \times 10^{-6}$ daltones. En neumococo por el contrario parece ser que un DNA de alto peso molecular - (100×10^{-6} d) es el más adecuado (Ver Tabla No. 2).

El DNA aislado como se describe en materiales y métodos consiste

Tabla 1.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE DNA EN LA FRECUENCIA DE TRANSFORMACION.*

CONCENTRACION MICROGRAMOS / ML.	N° DE TRANSFORMANTES EN 9×10^8 cel/ ml.		
	MARCADOR		SELECCIONADO.
	ARG.	LEU.	HIS.
1	14	5	1
8	39	36	11
29.5	80	53	36
80	83	56	13
290	115	46	27
0	20	5	6

* Tamaño del DNA = 30×10^6 d.
 DNA del Donador = JM 261
 DNA del Receptor = JM 250.

Tabla 2.- EFECTO DEL TAMAÑO DEL DNA TRANSFORMANTE EN LA FRECUENCIA DE TRANSFORMACION.*

ON.*

TAMAÑO.	N° DE TRANSFORMANTES. EN 1.5×10^9 cel / ml.			
	MARCADOR		SELECCIONADO.	
MILLONES DE DALTONES.	PRO.	HIS.	ARG.	LEU.
30 — 300.	14	35	23	23
20 — 40.	36	125	129	76
10	15	48	128	140

* CONCENTRACION DEL DNA = 66 microgramos/ml.
DNA DEL DONADOR = JM 261
CEPA RECEPTORA = JM 250

en su gran mayoría de moléculas que son mayores de 60×10^{-6} d. Como se muestra en la Tabla No. 2 cuando este DNA se fragmentó a un peso molecular mas pequeño, la actividad transformante aumentó considerablemente (46). Se obtiene un máximo cuando el DNA tiene un peso molecular promedio de $10-30 \times 10^{-6}$ d. Oishi (45) reporta que cuando el DNA tenía un peso molecular inferior a 10×10^{-6} d, la frecuencia de transformación cae drásticamente, lo cual está de acuerdo con lo reportado en otros sistemas como neumococo y B. subtilis.

Existen en la literatura algunos reportes previos así como otros que aparecieron en el transcurso de este trabajo en donde se menciona la introducción de información genética heteróloga entre organismos de diferente especie. (Ver Tabla No. 3). En 1973 Cosloy y Oishi (45) intentaron transformar a E. coli K₁₂ con DNA heterólogo (DNA de timo de ternera, B. subtilis y E. coli B) reportando resultados negativos sin más investigación a fondo al respecto. En nuestro laboratorio decidimos intentar transformar a E. coli K₁₂ recB⁻ recC⁻ sbcB⁻ con DNA de B. subtilis, Neurospora crassa y Salmonella typhis. (Ver Tabla No. 4)

Como puede observarse en la Tabla No. 4, tampoco fue posible transformar a E. coli K₁₂ recB⁻ recC⁻ sbcB⁻ con DNA heterólogo salvo en el caso de Salmonella typhi en donde parecía haber un número de transformantes un poco arriba de la frecuencia de reversión de la cepa JM 250 para los marcadores seleccionados. En base a todo lo antes mencionado pensamos que la ausencia o la baja frecuencia de transformación con DNA heterólogo podría deberse entre otras cosas a:

- 1). Selectividad en la penetración a nivel de pared o de membrana.
- 2). Restricción del DNA heterólogo
- 3). Falta de homología

El primer problema fue lo suficientemente aclarado por Wackerna-

TABLA 3

ALGUNOS SISTEMAS EN LOS CUALES SE HA REPORTADO EL PASO DE MATERIAL GENETICO ENTRE DOS ORGANISMOS DE DIFERENTE ESPECIE.

MECANISMO	ORGANISMOS DNA DONADOR.	INVOLUCRADOS DNA RECEPTOR.	TIPOS DE GENES TRANSMITIDOS. REF.
-----------	-------------------------------	----------------------------------	--------------------------------------

Conjugación

<u>Salmenella typhimurium</u>	<u>Escherichia coli</u>	(55)	Todos los cromosomales.
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	<u>Escherichia coli</u>	(56)	Operón nif, genes -- que codifican para -- enzimas de la fijación de nitrógeno atmosférico.
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	<u>Escherichia coli</u>		Resistencia a penicilina, episomal en -- <u>Pseudomonas</u> y cromosomal en <u>E. coli</u> .

Transducción

Lambda gal (<u>E. coli</u>)	Fibroblas -- tos humanos galactosémi-- cos.	(57)	Genes del operón de-- galactosa de <u>E. coli</u> que permiten utili--zar a la galactosa -- como fuente de carbo--no.
Lambda gal (<u>E. coli</u>)	Callos de -- Tomate	(58)	Operón de la galacto--sa.

Transformación

- | | | | |
|--|--------------------|------|---|
| DNA de <u>Stre-</u>
<u>tomyces coe-</u>
<u>licolor</u> | <u>B. subtilis</u> | (59) | Genes que codifican-
para enzimas biosin-
téticas. Curación de
auxotrofia. |
| DNA de <u>Salmo</u>
<u>nella typhi.</u> | <u>E. coli</u> | (61) | Genes que codifican-
para enzimas biosin-
téticas. Curación de
auxotrofia. |
| DNA Episomal
Híbrido en--
tre <u>Salmone-</u>
<u>lla panama</u> y
<u>E. coli.</u> | <u>E. coli</u> | (62) | Resistencia episomal
a antibióticos. |
| DNA Episomal
Híbrido en--
tre <u>Staphilo</u>
<u>cocus aureus</u>
y <u>E. coli</u> | <u>E. coli</u> | (63) | Resistencia episomal
a penicilina. |
| DNA Episomal
Híbrido en--
tre <u>Xenopus-</u>
<u>leavis</u> y <u>E.</u>
<u>coli.</u> | <u>E. coli</u> | (64) | Transcripción y Re--
plicación del DNA de
<u>Xenopus leavis</u> que -
codifica para el RNA
ribosomal 28S y 18S. |

TABLA 4. TRANSFORMACION DE LA CEPA JM 250 (recB recC sbcB treo⁻,
leu⁻, his⁻, arg⁻, pro⁻) USANDO DNA DE DIFERENTE FUENTE.

DNA DEL DONADOR	CONC. DE DNA EN µg/ml.	N° DE COLONIAS EN 10 ⁹ cel / ml.		
		LEU	ARG	HIS
JM 250 (control)	230	5	26	7
JM 261 (silvestre)	66	143	146	127
<u>Salmonella typhi</u>	240	10	38	12
<u>B. subtilis</u>	210	3	15	7
<u>Streptomyces phaeo.</u>	320	4	17	5

gel (46) quien demostró que tanto el DNA homólogo como el heterólogo (DNA de timo de ternera en este caso) tenía la misma probabilidad de entrar. También encontró que existía un efecto de inhibición en la transformación por medio de DNA heterólogo cuando compite con DNA homólogo.

En cuanto al segundo punto, los datos obtenidos en este laboratorio sugerían que probablemente los mecanismos de restricción de E. coli K₁₂⁻ combinados con la falta de homología entre los genomas del donador y receptor eran los responsables de que se pueda llevar a cabo transformación heteróloga en E. coli.

Decidimos investigar tanto la restricción así como la falta de homología por separado.

Para estudiar el efecto de la restricción en la frecuencia de transformación con DNA heterólogo construimos la cepa JM 259 por conjugación entre la JM 55 X JM 250, seleccionando para Treo + y buscando aquellas recombinantes en las cuales la eficiencia de plateo del fago lambda_K y lambda modificado por E. coli B fuese la misma.

TRANSFORMACION EN E. coli recB⁻ recC⁻ sbcB⁻ hsr⁻ (JM 259) QUE NO RESTRINGE-DNA HETEROLOGO.

Como puede verse en la Tabla No. 5, la frecuencia de transformación de esta cepa (JM 259) con DNA de Salmonella typhi aumentó considerablemente con respecto a una cepa hsr+. Los resultados para los otros DNAs son negativos, por lo que pensamos que aparte del problema real que es la restricción para la "supervivencia" del DNA no modificado por E. coli K₁₂, la homología de bases es la que en última instancia va a permitir que se integre el DNA lineal en el cromosoma de E. coli mediante el fenómeno de recombinación.

Con el objeto de demostrar hasta que punto es importante que exista una región de homología de bases para que se lleve a cabo la integra-

Tabla 5.- TRANSFORMACION DE LA CEPA JM 259 (recBC sbcB hsr⁻ treo⁺ leu⁻ his⁻ arg⁻ pro⁻ xil⁻ ara⁻ lac⁻ gal⁻ mtl⁻). *

CEPA DONADORA	FRECUENCIA DE TRANSFORMACION			FRECUENCIA DE REVERSION		
	ARG	HIS	LEU	ARG	HIS	LEU
	X 10 ⁻⁸			X 10 ⁻⁹		
JM261 (recBC sbcA Endo I gal ⁻)	10	2.0	5.0	2.9	6.6	5.5
JM1004 (<u>Salmonella typhi</u>)	7.0	9.6	4.0	"	"	"
<u>Strep. phaeocromogenes</u>	—	—	—	"	"	"
<u>B. subtilis</u>	—	—	—	"	"	"
<u>Neurospora crassa</u>	—	—	—	"	"	"

* CUENTAS VIABLES + 1 X 10⁹ células/ml.
 CONCENTRACION DE DNA = 196 microgramos/ml.

Fig. 5 CURVA DE CONC. DE DNA VS. N° DE TRANSFORMANTES/ml. -
 TRANSFORMACION DE LA CEPA JM 259 (rec BC sbcB hsr
 leu, arg, pro, xil, lac, mt1, gal, ara). -
 POR DNA DE LA CEPA JM 261 (rec BC sbcA Endo I gal)
 CUENTA VIABLES 9.5×10^{-8} cel/ml.

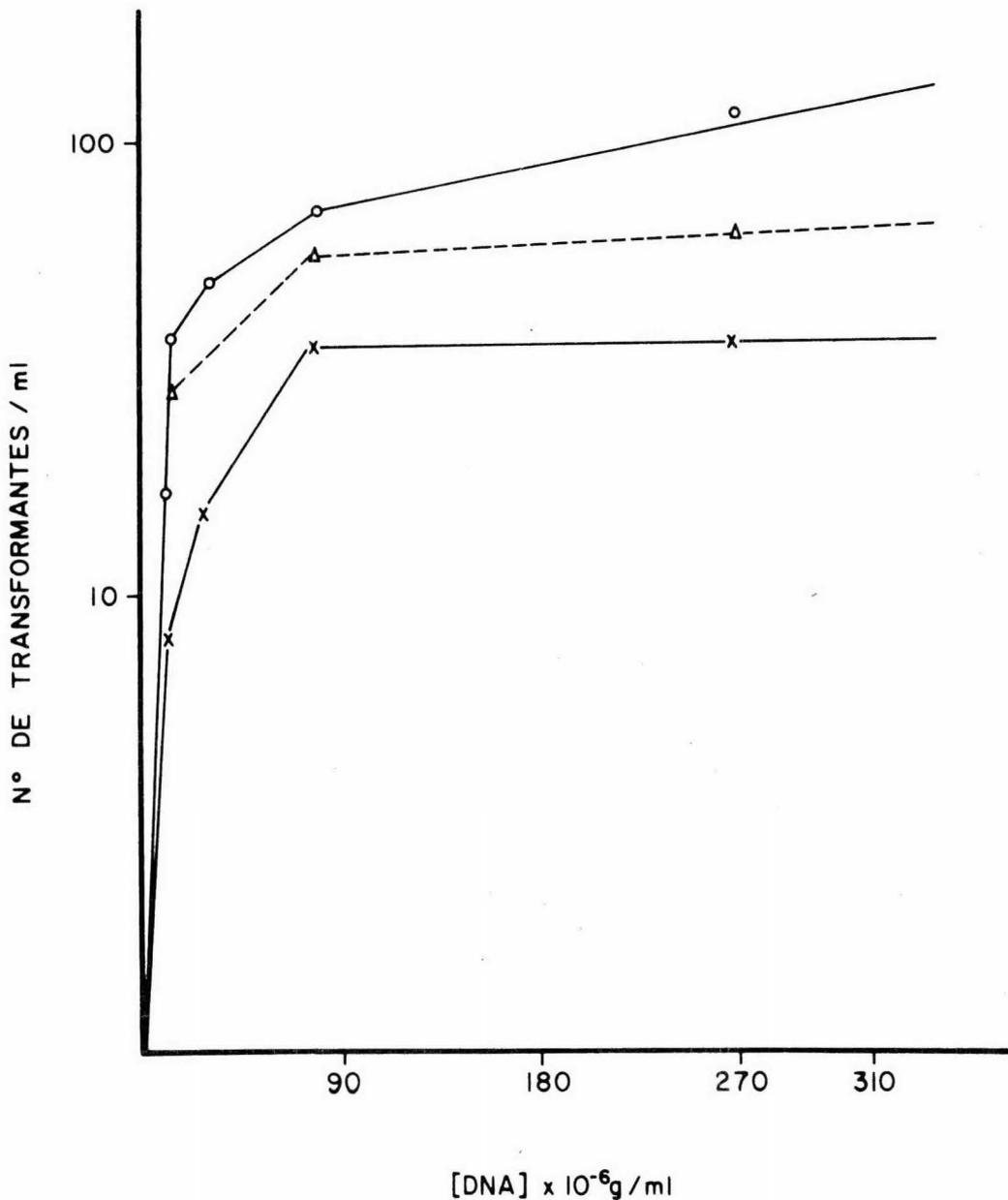
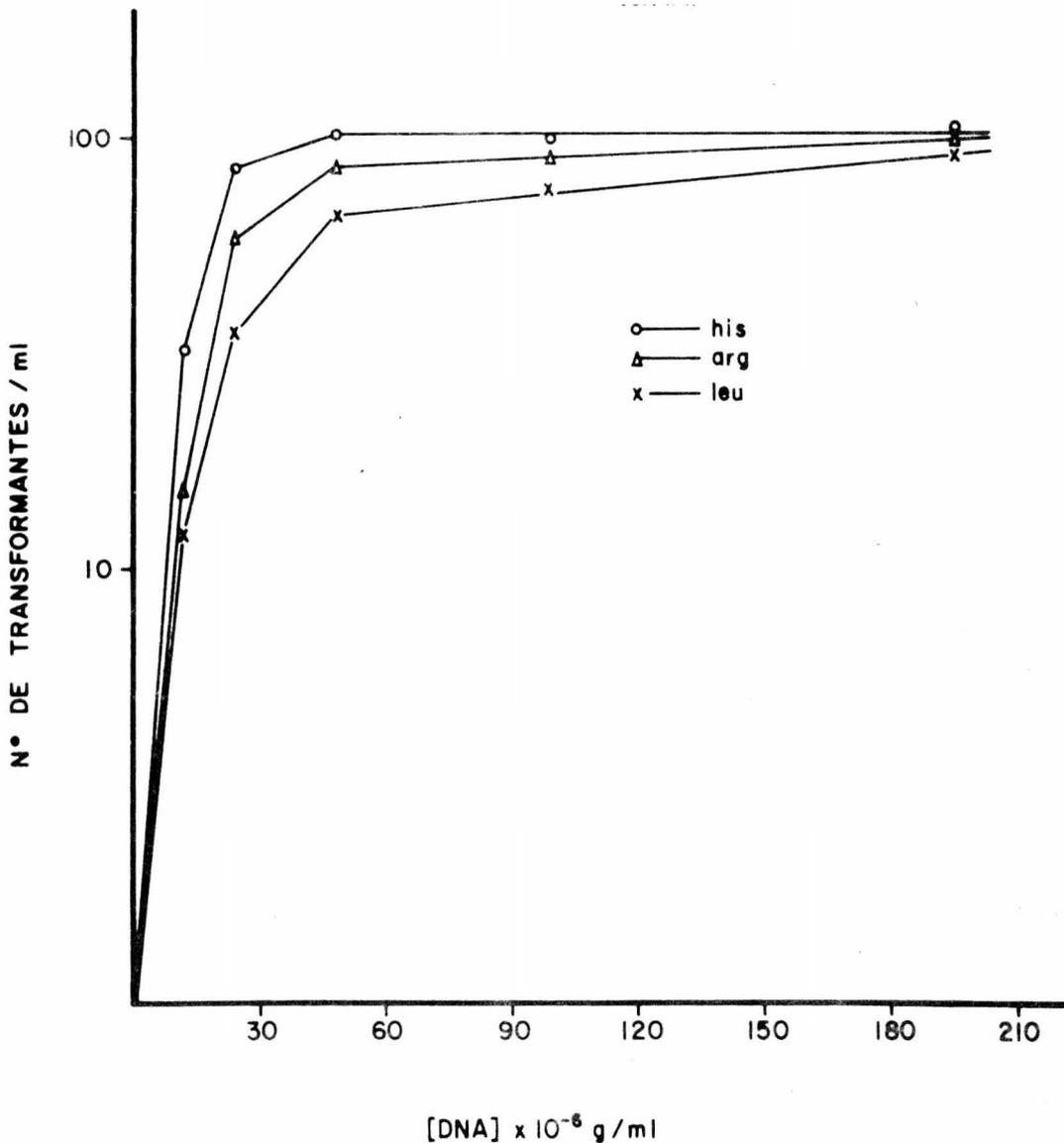


Fig. 6 CURVA DE CONC. DE DNA VS. N° DE TRANSFORMANTES/ml.
 TRANSFORMACION DE LA CEPA JM 259 (rec⁻ BC sbcB hsr⁻
 leu⁻, his⁻, arg⁻ pro⁻, zil⁻, lac⁻, mtl⁻, gal⁻, ara⁻)
 POR DNA DE LA CEPA JM 1004 (salmonella typhi prototrofa.)
 CUENTAS VIABLES 1×10^7 cl/ml.



ción de una región determinada, construimos la cepa JM 258 con la cual diseñamos el siguiente experimento:

TRANSFORMACION EN E. coli $recB^- recC^- sbcB^- hsr^+$, $\Delta ara - leu$ (JM 258).

La cepa JM 258 se obtuvo por transducción del fago P_{1vir}^{59} sobre la cepa JM 250, seleccionando para $Treo^+$ con el objeto de tener una cepa con una delección de los genes que codifican para la utilización de la arabinosa como fuente de carbono y de los genes encargados de la biosíntesis de --leucina en una cepa con características $recB^- recC^- sbcB^-$.

Los resultados obtenidos al transformar a esta cepa con DNA de una cepa protótrofa (JM 261), fueron sorprendentes en el sentido de que en 10^{13} células se encontró solamente una colonia transformante que resultó --ser fenotípicamente Leu^+ y Ara^+ . Con el objeto de conocer el genotipo de esta nueva cepa a la cual denominamos JM 262, se creció el fago P_{1vir} en ella y se infectó con él a una cepa JM 59 ($treo^- leu^+ ara^+$). Se encontró que el ---100% de las cotransductantes $Treo^+ - Leu^-$ también resultaba ser ara^- . Este hecho demuestra que la delección sigue existiendo en el mismo sitio y que probablemente el segmento cromosomal que lleva la información para la utilización de arabinosa y la biosíntesis de leucina (aproximadamente 0.5' del cromosoma bacteriano) de la cepa donadora se encontraba integrado o estabilizado de alguna manera en otra región del genoma. Esto nos recuerda el caso --del profago lambda el cual se inserta linealmente en el minuto 17.5 del cromosoma bacteriano de E. coli K_{12} en un locus denominado "sitio de unión del profago lambda". Cuando se infecta una cepa que posee una delección de este sitio se encuentra que en la gran mayoría de los casos al no encontrar un sitio de homología con el cual recombinar, éste pasa a fase vegetativa y mata a la bacteria huésped. Sólo en casos muy raros es posible encontrarlo insertado en otras regiones del cromosoma.

En base a todos los datos anteriormente presentados pensamos que en el caso de que tuvieramos transformantes de E. coli con DNA heterólogo - (Bacillus subtilis, Neurospora crassa y Streptomyces phaeocromogenes) éstas-

iban a ser una o dos colonias de un número muy grande de células plateadas.- Un problema que nos impediría ver este fenómeno es la reversión, que aunque es baja, existe y por lo tanto no nos permitiría distinguir entre una verdadera transformante y una colonia revertante.

CONSTRUCCION DE LA CEPA JM 263 $recB^- recC^- sbcB^- hsr^- pyrA^-$ (Mu).

Con el objeto de tener, un marcador cuya frecuencia de reversión fuese igual a cero construimos la cepa JM 263. Cabe mencionar aquí que las únicas formas que se conocen hasta el momento para tener un marcador que no revierta son:

- a). Tener una delección de esa región en particular, y
- b). Que haya sido mutagenizado por medio de la inserción lineal del profago Mu-1 en ese gene en particular.

El fago Mu-1 es uno de los mutágenos más poderosos y eficientes que se conocen. Cuando se inserta linealmente intergénicamente puede causar una mutación silenciosa pero en cambio si se inserta intragénicamente produce mutación. Es posible producir mutantes auxotróficas para cualquier metabolito, así como también aislar mutantes para fermentación de azúcares, resistencia a bacteriofagos, etc.

Decidimos introducir el gene $pyrA$ (Mu-1) (gene estructural de la enzima carbamil fosfato sintetasa) por transducción en una cepa con características $recB^- recC^- sbcB^- hsr^-$ para lo cual crecimos el fago $P_{1}vir$ en la cepa JM 259 e infectamos con éste a una cepa $recB^- recC^- sbcB^- pyrA$ (Mu-1) - (JM 253) la cual había sido obtenida por conjugación entre una cepa $Hfr pyrA$ (Mu-1) (JM 59) X JM 252. De las 50 colonias transducentes para $Treo^+$ tomadas, se seleccionaron aquellas que presentaban una igual frecuencia de infección tanto con un fago λ_K como con uno modificado por coli B. Esta cepa se denominó JM 263. Su genotipo es: $recB^- recC^- sbcB^- treo^+$, $pyrA$ (Mu-1) pro^+ , hsr^- , hsm^+ , $sup Sm^R$.

TRANSFORMACION DE LA CEPA JM 263 $recB^-$ $recC^-$ $sbcB^-$ hsr^- $pyrA^-$ (Mu-1). (ver -
tabla No. 6).

Los resultados obtenidos no fueron muy diferentes a los obteni--
dos con la cepa JM 259, en el sentido de que tampoco fue posible lograr ---
transformación con DNA de B. subtilis, Neurospora crassa y Streptomyces phae
ocromogenes.

Un punto importante que cabe mencionar aquí es que Kono G, en --
1973 (65), en este laboratorio encontró datos suficientes que sugieren que -
la presencia del fago Mu-1 en un locus determinado del genoma bacteriano au-
menta la frecuencia de recombinación para ese locus en particular. En nues-
tro caso encontramos un pequeño aumento en la frecuencia de transformación -
cuando se transformó para un marcador en el cual se encontraba integrado li-
nealmente como profago el fago Mu-1. Por el momento no sabemos hasta que --
punto es significativo el hecho de que en esta cepa la frecuencia de trans--
formación cuando se usa como DNA donador tanto de Salmonella como de E. coli
li, sea la misma. De cualquier manera seguimos trabajando sobre éste en par-
ticular.

DATOS GENETICOS QUE INDICAN QUE EL SEGMENTO DE DNA DE Salmonella typhi O DE
E. coli K_{12} QUE LLEVA LA INFORMACION RESPONSABLE DE LA BIOSINTESIS DE ARGI-
NINA Y DE PIRIMIDINAS INTRODUCIDO POR TRANSFORMACION EN LA CEPA JM 263, ESTA
INTEGRADO EN EL GENOMA DE LAS CELULAS TRANSFORMANTES JM 265 y JM 266.

Tanto la cepa JM 265 que es una bacteria transformante de la cepa
JM 263 para $pyrA$ con DNA de Salmonella, como la cepa JM 266 con DNA de -
E. coli no son lisogénicas para Mu-1, hecho que sugiere que hubo una recomb-
inación con la posterior segregación del segmento que llevaba a Mu-1 inserta-
do linealmente en él. (Ver diagrama No. 7).

Posibilidades alternativas a lo antes descrito son:

I). El nuevo segmento introducido por transformación que lleva-
el gene $pyrA$ suprime fenotípicamente la expresión de Mu-1 y además:

Tabla 6.- TRANSFORMACION DE LA CEPA JM 263(recBC sbcB hsr⁻ pirA(Mu-1) leu⁻
his⁻ xil⁻ ara⁻ lac⁻ mtl⁻ gal⁻) *

CEPA DONADORA	FRECUENCIA DE TRANSFORMACION	FRECUENCIA DE REVERSION PARA pyrA (mu-1)
JM261 (recBC sbcA Endo I gal ⁻)	12 x 10 ⁻⁸	0%
JM1004 (Salmonella typhi)	11.5 x 10 ⁻⁸	0%

* CUENTAS VIABLES = 1.2 X 10⁹ células /ml.
CONCENTRACION DE DNA = 250 microgramos/ml.

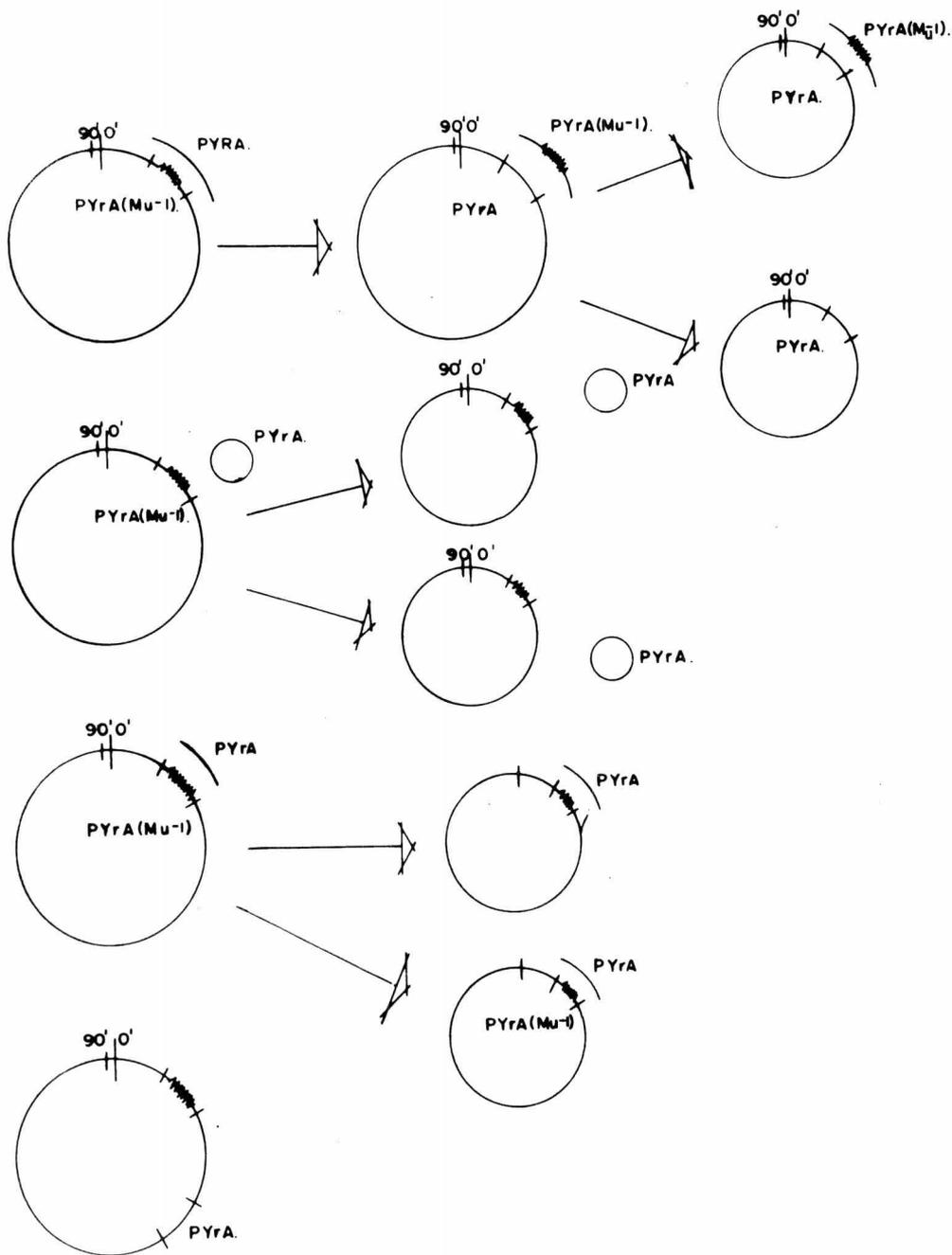


Fig. 7.- Diversas formas alternativas de estabilización del segmento de DNA introducido por transformación, propuestas en el presente trabajo.

II). Este segmento quedara como un DNA con características extracromosomales (episoma) y se replicara.

III). Estuviera adosado.

IV). Estuviera insertado en algún otro sitio del cromosoma.

Con el objeto de probar cual de las opciones antes descritas es la más probable se realizaron los siguientes experimentos:

I. COTRANSDUCCION CON EL MARCADOR $TREO^+$ DEL GENE PYRA.

Se creció el P_{1} vir en las cepas JM 265 y JM 266 respectivamente. Estas cepas tienen un genotipo $treo^+ pyrA^+$ y se infectó con ellos a la cepa JM 55 ($treo^- pyrA^-$ (Mu-1) y a la cepa JM 255 ($treo^- pyrA^+$). En ambos casos se seleccionaron transductantes para $Treo^+$, preguntándonos de éstos el % de cotransducción para el gene $pyrA^+$ así como para $pyrA^-$. (Ver tabla No. 7)

Este experimento de cotransducción sugiere que el segmento de -- DNA transformante está localizado en el mismo sitio en donde estuvo el fago-Mu-1 integrado, es decir adyacente a $treo$ en el minuto 0.5 del cromosoma de E. coli K_{12} . (ver tabla No. 7). Este hecho también sugiere que el fragmento transformante no se encuentra ni adosado ni en forma extracromosomal.

II. CURACION CON NARANJA DE ACRIDINA Y RIFAMPICINA.

El colorante anaranjado de acridina se sabe que se une selectivamente a DNAs de naturaleza "supercoiled" como son la gran mayoría de los episomas y plásmides que se conocen, impidiendo su replicación.

La rifampicina es un antibiótico que interacciona con la subunidad beta de la RNA polimerasa impidiendo la transcripción del mensaje genético. En ninguno de los dos casos se sabe con certeza cual es el mecanismo involucrado en la inhibición selectiva de la replicación de estos elementos ex

Tabla 7.- FRECUENCIA DE COTRANSDUCCION ENTRE $pirA^+$ y $treo^+$. CRECIENDO P_1 vir ENJM 265 Y JM 266 (Cepas transformadas para $pyrA^+$ de la cepa JM 263 por DNA de JM 1004 y JM 261 respectivamente). EL MARCADOR SELECCIONADO FUE Treo.

CRUZAS	Treo ⁺		FRECUENCIA DE COTRANSDUCCION. %
	$pirA^+$	$pirA^-$	
PI vir265 XJM55 (BI^- $treo^-$ $pirA^-$)	18/40	22/40	45
PI vir266 XJM55	19/40	21/40	47.5
PI vir265 XJM255(hsr^- $treo^-$ $pirA^+$)	120/120	0/120	—
PI vir266 XJM255	120/120	0/120	—

tracromosomales. El resultado de tratar a las cepas transformantes JM 265 y JM 266 a una concentración tal que se obtiene el 90% de curación de un factor F'lac el cual fue introducido por conjugación (JM 377 X 265 y JM 377 X 266) fue negativo, hecho que sugiere que esta información introducida por transformación no tiene un carácter episomal.

III. COTRANSFORMACION

Otro dato que habla en favor de la integración mediada por un verdadero mecanismo de recombinación es la cotransformación de un marcador negativo para lo cual se construyeron las cepas que se mencionan a continuación:

1). JM 267 (treo^+ pyrA^- (Mu-1), ara^+ recB^- recC^- sbcB^- hsr^-). Se obtuvo por medio de transducción, para lo cual se infectó a la cepa JM 263 con el fago P_1 vir crecido previamente sobre la cepa JM 51. Se seleccionaron las colonias ara^+ (capaces de utilizar a la arabinosa como fuente de carbono) en un medio selectivo para azúcares llamado Mac Conkey (Difco) el cual contiene un colorante que tiñe de rojo a las cepas capaces de utilizar un azúcar determinado como única fuente de carbono.

2). Salmonella typhi ara^- a la cual se le denominó JM 1 005, la cual fue aislada también en medio Mac Conkey solo que esta vez se sometió a un mutágeno químico como es la nitrosoguanidina.

La cepa usada como receptora fue la JM 267 y las donadoras la JM 1005 (Salmonella) y la JM 51 (E. coli) (Ver tabla No. 8).

EVIDENCIAS BIOQUIMICAS DE QUE LA ENZIMA CARBAMIL FOSFATO SINTETASA EN LA CEPA TRANSFORMANTE POR DNA DE SALMONELLA ES LA CARBAMIL FOSFATO SINTETASA DE Salmonella typhi.

El carbamil fosfato, producto de la reacción catalizada por la enzima llamada carbamil fosfato sintetasa, es requerido para la vía de bio--

Tabla 8.- COTRANSFORMACION DE MARCADORES CERCANOS EN LA CEPA JM 267(recBC sbcB hsr⁻

leu⁻ his⁻ pirA⁻ (Mu-1) ara⁺ lac⁻ mtl⁻ gal⁻) *

CEPA DONADORA	FRECUENCIA DE TRANSFORMACION	% DE COTRANSFORMACION leu ⁺ — ara ⁻
JM 51 (leu ⁺ ara ⁻)	6×10^{-8}	10 %
JM1005 (<u>Salmonella typhi</u>) ara ⁻ (NTG)	5×10^{-8}	3.2 %

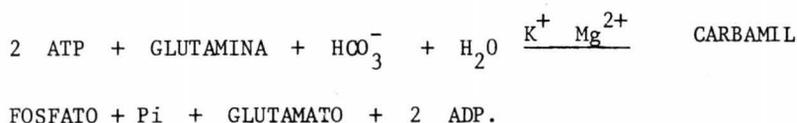
+ CUENTAS VIABLES = 1×10^9 células/ml.

CONCENTRACION DE DNA = 196 microgramos/ml.

síntesis de arginina como para la de pirimidinas. Este hecho contribuye a - muchas de las propiedades únicas de la enzima en el sentido de que su activi- dad está regulada por intermediarios de ambas vías metabólicas. En las ente- robacterias así como en *B. subtilis* solo se ha demostrado la presencia de -- una sola especie de carbamilo fosfato sintetasa-glutamino dependiente responsa- ble de la biosíntesis del carbamil fosfato. Esto aparentemente no es un he- cho general entre los microorganismos ya que en *Neurospora crassa* existen - dos CPS distintas, una específica para la biosíntesis de pirimidinas y la - otra para la biosíntesis de arginina. El carbamil fosfato producido por una de ellas no está disponible para la otra vía biosintética.

PROPIEDADES DE LAS CARBAMIL FOSFATO SINTETASAS DE *Salmonella* Y DE *E. coli*.

Anderson y Meister demostraron que la reacción catalizada por la enzima altamente purificada de *E. coli* B era: (66).



Esta reacción procede en 3 pasos:

- 1). $\text{Enzima-CO}_3\text{PO}_3 + \text{Glutamina} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Enzima CO}_2\text{PO}_3 + \text{ADP}.$
- 2). $\text{Enzima-CD}_3\text{PO}_3 + \text{Glutamina} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Enzima NH}_2\text{CO}_3^- + \text{ADP}.$
- 3). $\text{Enzima-NH}_2\text{CO}_2^- + \text{ATP} \rightarrow \text{Enzima} + \text{Carbamil fosfato} + \text{ADP}.$

En (1) el ATP reacciona con el HCO_3^- , formando un anhidrido --- (carbonato-fosfato) unido a la enzima. En 2 este anhidrido reacciona con -

glutamina para producir un carbamato enzima. Finalmente en 3 este carbamato es fosforilado con una segunda molécula de ATP, dando un carbamil fosfato.

La glutamina es el donador preferido de grupos amino, a pesar de que con amoniaco trabaja también aunque con un Km 200 veces mas grande que - para glutamina.

La CPS de E. coli muestra un efecto cooperativo para la unión - de ATP ya que presenta una curva sigmoideal en una gráfica de velocidad de -- reacción contra concentración de sustrato. El Km para la reacción es de 8×10^{-4} M. Los otros sustratos, bicarbonato y glutamina no dan curvas sigmoides sino hiperbólicas con Kms aparentes de 12×10^{-4} M y 3.8×10^{-4} M respectiva-- mente.

La actividad de la enzima está sujeta a retroinhibición por UMP (uridin monofosfato) y es activada por ornitina o por IMP (inosin monofosfato). El mecanismo por el cual estos reguladores alostéricos positivos o negativos modulan la acción de la enzima no se conoce, pero la presencia de un efector positivo (ornitina o IMP) disminuye la concentración de ATP requerida para alcanzar la mitad de la velocidad máxima. La presencia de un efec-- tor negativo (UMP) causa el efecto contrario. Todo ésto sugiere que lo que parece ser alterado es la afinidad de la enzima por ATP. La vital importan-- cia de estos efectores se hace más obvia cuando se observa el efecto de la - presencia del modulador en el patrón de sedimentación de la enzima en gra--- dientes de sacarosa. (Ver diagrama No. 8).

La CPS de Salmonella typhimurium al igual que la enzima de E. coli, es inhibida por UMP, ornitina revierte la inhibición causada por UMP - así como también activa a la enzima en ausencia de UMP. (67). Las curvas de concentración contra velocidad son muy parecidas en ambas enzimas tanto para ATP como para bicarbonato y glutamina. Sin embargo existe una diferencia bá-- sica encontrada por Abd-El/al e Ingrahan (67) y es que mientras la CPS de E. coli es activada por IMP (66), la de Salmonella no presenta tal activación. (Ver Tabla No. 9).

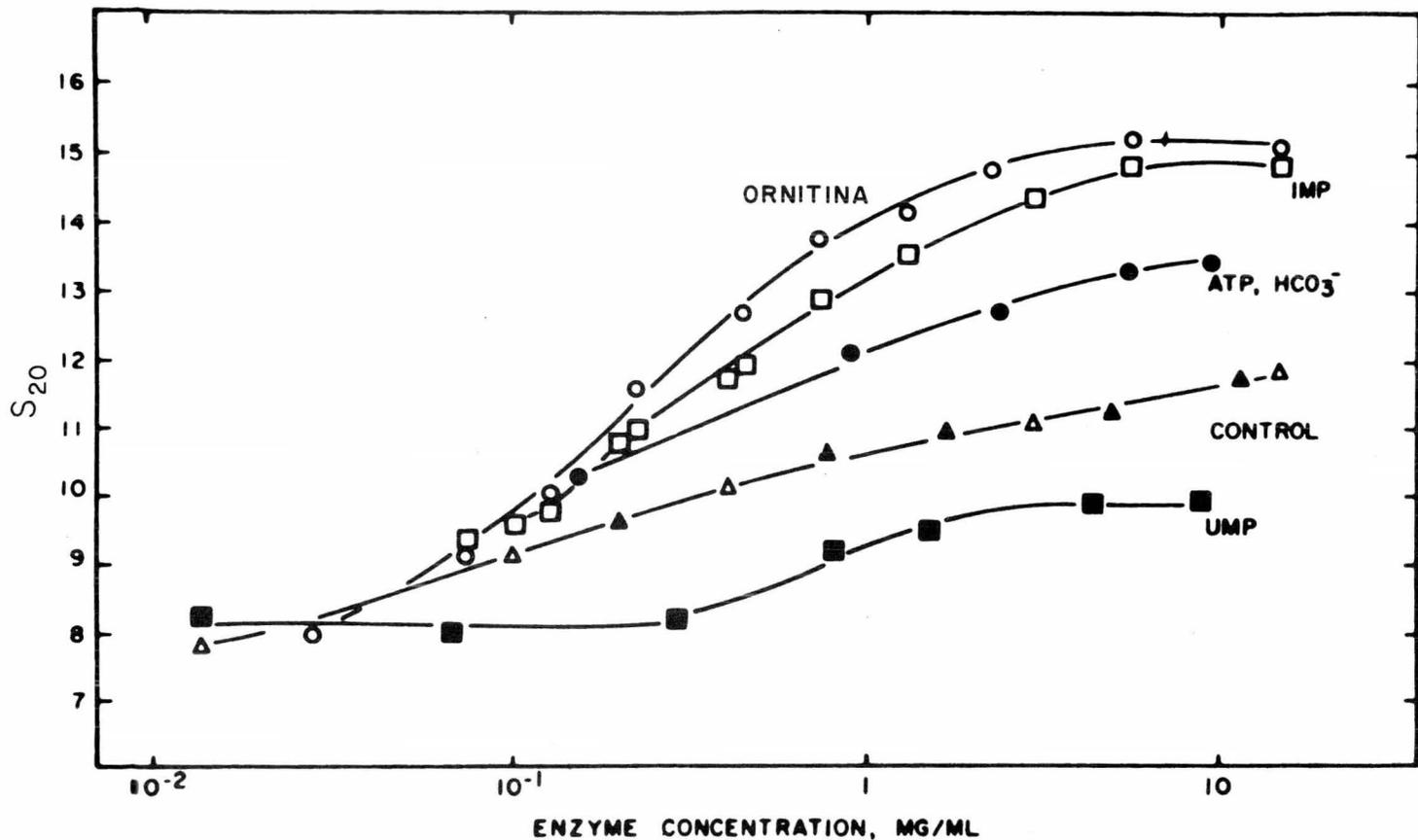


Fig. 8.- Efecto de la concentración de la enzima carbamil fosfato sintetasa en la constante de sedimentación de la enzima en presencia de los efectores que se indican en la figura.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE CARBAMIL FOSFATO SINTETASA DE LAS CEPAS TRANSFORMADAS POR DNA DE - Salmonella typhi y E. coli en y sin la presencia - de IMP.

C E P A S	ACTIVIDAD ESPECIFICA*		% de actividad
	-IMP	+IMP	
JM261 (recBC sbcB Endo I gal ⁻)	1.672	2.84	170%
JM1004 (<u>Salmonella typhi</u>)	1.2275	1.212	≈ 99%
JM266 (TRANSF. DNA Coli)	1.497	3.18	≈ 213%
JM265 (TRANSF. DNA Sal)	1.4925	1.2090	≈ 82%
JM263 (Cepa receptora.)	—	—	—

CP = Carbamil fosfato.

IMP = Inosin monofosfato

* ACTIVIDAD ESPECIFICA = μ moles de carbamil fosfato formado por mg. de proteina por hora.

Por último en base a los resultados presentados en este trabajo, podemos concluir que la integración del segmento transformante se llevó a cabo en el sitio correspondiente del cromosoma de *E. coli* y que es en efecto - la enzima de Salmonella typhi la que se está expresando ahora en E. coli.

CONCLUSIONES

La transformación se presenta en este momento como el mecanismo mas idóneo para introducir y estabilizar fragmentos selectos de DNA, tanto de microorganismos como de organismos superiores en E. coli.

Las evidencias obtenidas en este trabajo demuestran sin embargo que existen limitaciones serias, siendo tal vez la mas importante la falta de regiones de homología entre el DNA del donador y el del receptor.

Pensamos que el hecho de haber logrado transformar con DNA lineal de Salmonella typhi a E. coli se debió en gran parte a que ambos microorganismos son enterobacterias, por lo cual es de esperarse que se presente un cierto grado de homología entre ambos genomas.

Por otro lado cabe mencionar que la transformación con DNA lineal nos limitaría a poder introducir solamente DNAs de organismos filogenéticamente cercanos. Ya que nuestro objetivo último es la estabilización de información genética proveniente de cualquier organismo en E. coli, tendríamos que encontrar un sistema que presentase un alto grado de generalidad y versatilidad para lograrlo. Un sistema que presenta muchas ventajas y características como las antes mencionadas es la transformación con DNA circular como por ejemplo plásmides, los cuales no tie

nen que recombinar con el genoma bacteriano para poder estabilizarse, -- son capaces de autoreplicarse, de caracter dispensable para la célula y se pueden transferir con relativa facilidad entre algunas especies de microorganismos.

En 1973 Cohen et al (62) demuestran la transformabilidad de E. coli K₁₂ con un factor de resistencia a varios antibióticos. Otra ventaja que presenta este sistema es que la cepa receptora no requiere ser recB recC sbcB debido a que el DNA circular es el único tipo de DNA resistente a la acción de deoxiribonucleasas tales como la Exo V(recB recC) y la Exo I(sbcB).

Algunas preguntas que surgen en este punto en cuanto a la transformación con DNA circular son:

1).- ¿Hasta qué punto es posible encontrar episomas de cualquier organismo (procariote o eucariote) que se desee?

2).- ¿Qué tipo de información estaría en ellos incluida?

3).- ¿Hasta qué punto es posible la estabilización de un episoma de un eucariote, en dado caso de que existiera, en E. coli K₁₂?

Recientemente, Cohen y Boyer (62) lograron transformar a E. coli con un factor de resistencia construido "in vitro". Cuando un plásmide como por ejemplo el R-6 que confiere resistencia a Sulfonamida (Su), Cloranfenicol (Cm), Kanamicina (km), Neomicina (Nm), Tetraciclina (Tet) y Estreptomicina (Sm) con un peso molecular de 65×10^6 daltones, es sometido a la acción de una endonucleasa de restricción (R₁) el plásmide es hidrolizado en 12 distintos fragmentos, esto sugiere que en este plásmide se encuentran solo 12 sitios que son reconocidos por esta enzima.

Si el producto límite de la hidrólisis de la enzima de restricción R₁ sobre el plásmide R₆ (12 fragmentos), se incuba durante un tiempo determinado a 40°C. y se toman de esta mezcla de reacción tanto muestras

para transformar como para su observación al microscopio electrónico y - separación por electroforesis en geles de agarosa, se obtienen una gama de plásmides de todos tamaños, desde uno pequeño al que denominaron ps - 101 el cual pesa 5.8×10^6 d. y que lleva la información genética necesaria tanto para su propia replicación como para la expresión de la resistencia a tetraciclina, hasta otros con los mismos patrones de resistencia y peso molecular del R-6 original.

La enzima de restricción Eco R₁ rompe DNA de doble hélice en -- una secuencia única, haciendo dos rupturas de hélice sencilla de una manera alternada generando con esto extremos 5' fosfato y 3' hidroxilo. -- Los extremos de hélice sencilla producidos en cada corte tienen secuencias idénticas y complementarias de 4 a 6 nucleótidos de largo, por lo -- tanto el sitio de rompimiento de la enzima posee un eje rotacional de do ble simetría perpendicular al eje de la hélice. Este hecho da lugar a lo que se conoce como "extremos translapantes" de tal manera que los frag-- mentos generados por esta enzima pueden asociarse por puentes de hidróge no con otros fragmentos producidos por la misma enzima. Una vez estable-- cidos los puentes de hidrógeno, los extremos 3' -OH y 5' fosfato pueden-- ser unidos por una ligasa, obteniéndose de esta manera especies híbridas entre moléculas que poseen el sitio de restricción de la enzima.

Se ha calculado que la frecuencia con la que se presenta esta - secuencia de 4-6 pares de nucleótidos es de 1 en 4 000 a 16 000 pares de nucleótidos, lo que significa que la mayoría de los fragmentos generados por la enzima EcoRI deben de contener al menos 1 ó más genes intactos. (68).

Finalmente en 1974 hay tres reportes muy importantes. En el pri-- mero de ellos que aparece, se reporta la transformación de E. coli K₁₂ - con plásmidos híbridos construídos "in vitro" entre un factor de resis-- tencia de E. coli y otro de Salmonella panama (62. Posteriormente apare-- ce otro reporte en donde se menciona la construcción de un plásmido en--

tre uno de E. coli y otro de Staphylococcus aureus (63) que confiere resistencia episomal a penicilina. Por último el reporte más importante -- por el precedente que sienta es la transformación de E. coli K₁₂ con un plásmido híbrido entre un factor de resistencia de E. coli y los genes -- que codifican para la producción del RNA ribosomal de la rana Xenopus laevis (64). Esto tiene una importancia tremenda en cuanto que se trata de la primera evidencia que se tiene de la replicación y transcripción de un DNA de un organismo superior en un procariote. Se abre además un panorama amplísimo que permite vislumbrar lo que será en un futuro la Ingeniería Genética, sus posibilidades y sus alcances.

En un futuro no muy lejano se podrán estudiar los mecanismos de regulación tan sutiles y complejos de una célula, como es la de un eucariote, en un sistema "mas sencillo" y fácil de manipular como es E. coli. Surge también la posibilidad de erradicar errores congénitos del metabolismo, tales como la diabetes o la galactosemia mediante el uso de una Ingeniería Genética planificada, así como también la posibilidad de solucionar uno de los problemas más graves a los que se enfrenta ya la Humanidad, como es la falta de alimentación de un mundo cada vez más sobrepoblado. Una solución a esto sería, por ejemplo, que microorganismos tales como E. coli, levaduras u hongos produzcan proteína de origen animal que posea un alto contenido en aminoácidos esenciales.

En un futuro cercano, se podrá hablar de cepas sobreproductoras de hormona del crecimiento o de insulina, siendo estas unas de las otras promesas que ofrece la Ingeniería Genética.

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

- 1).- Lederberg, J., J. Cellular Comp. Physiol., 45, suppl. 2, 75(1955).
- 2).- Lederberg, J., Genetics, 32, 505, (1947)
- 3).- Jacob, F, and Wollman, E.L.
Sexuality and Genetics of Bacteria.
Academic Press.
New York
(1967).
- 4).- Hopwood, D., Chartek, K. Dowding, J. and Vinan, A.,
Bacteriological Reviews., 37, 371 (1973).
- 5).- Campbell, A.
Episomes.
Harper and Row Publishers.
N.Y. and London.
(1969)
- 6).- Scaife, J., Episomes., Annual Review of Microbiology.
21, 601 (1967).
- 7).- Broda, P., Genet. Res. Comm., 9, 35 (1967).
- 8).- Ikeda, H., Cold Spring Harvor Symp. Quant. Biol., 33,
141 (1966)
- 9).- Britton, C., Transactions New York Academy of Sciences.,
1003 (1967)

- 10).- Hayes, W., Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., 18,
75 (1953)
- 11).- Cavalli, L.L., Bol. Ist. Sieroterap. Milan., 29,
281 (1950).
- 12).- Zinder, N.D. and Lederberg, J., J. Bacteriology., 64,
679, (1952)
- 13).- Whitehouse, H.K.L.
Toward an Understanding of the Mechanism of Heredity.
2nd. ed.
Edward Arnold.
London.
(1969).
- 14).- Morse, M.L., Lederberg, J., Genetics, 41,
142 (1956).
- 15).- Griffith, F., Hyg. J., 27,
113 (1928).
- 16).- Sia, R.H.P. and Dawson, M.H. J. Exptl. Med., 54,
701 (1931).
- 17).- Avery, O.T., MacLeod, C.M. and MacCartey, M., J. Exptl,
Med., 79, 137 (1944).
- 18).- Spizizen, J., Proc. Natl. Acad. Sci. US., 44,
1072 (1958).
- 19).- Spizizen, J., Fed. Proc., 18,
957 (1959).
- 20).- Balassar, R., Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.,
4,458 (1957).
- 21).- Schaeffer, P., Ann. Inst. Pasteur, 91,
192 (1956).
- 22).- Ephrussi, H., Taylor, A., Advances in Virus Research. 3,
275 (1955).
- 23).- Spizizen, J., Reilley, B.E. and Evans, A.H. Rev. Microbiol.
20, 371 (1966).
- 24).- Tomasz, A. Nature, Lond.,
208, 155 (1965).

- 25).- Felkner, I.C. and Wyss, O. Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 94 (1964).
- 26).- Charpak, M. y Debonder, R. Acad. Sci. Paris, 260, 5638 (1965).
- 27).- Pakula, R. Symp. Biol., Hung., 6, 33 (1965).
- 28).- Gómez, L. G. and Cole, R.M. J. Bacteriol., 110, 273-80 (1972).
- 29).- Taketo, A., J. Biochem. 71, 507 (1972)
- 30).- Stuy, J.H. y Stern, D.J. J. gen. Microbiol. 35, 391 (1964).
- 31).- Strauss, N., J. Bacteriol. 91, 702 (1966).
- 32).- Marmur, J. y Lane, D., Proc. Natl. Acad. Sci. US. 46, 453 (1960).
- 33).- Hall, B.D. y Spiegelman, J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47, 137 y 1135 (1961).
- 34).- Evans, A.
"The role of rna in reproduction and development".
Niu, M.C. y Segal, S.J. Editores.
North-Holland/American elsevier,
(1973).
- 35).- Mishra, N.C. Szabo, G. and Tatum., L.
"The role of rna in reproduction and development".
North-Holland/American elsevier.
(1973),
- 36).- Morrison, D.A. y Guild, N.R., "J. Bacteriol. 112, 1157-1168 (1972).
- 37).- Arber, W. y Dussoix, D. J. Mol. Biol. 18-36 (1962).
- 38).- Arber, W J. Mol. Biol. 11, 247 (1965).

- 39).- Meselson, M. y Yuan, R. Nature 217,
1110-1114 (1968).
- 40).- Avandhari, N.G., Mehta, B.M. y Rege, D.V. J. Mol. Biol.
42, 443 (1969).
- 41).- Keiser, A.O. y Hogness, D.S. J. Mol. Biol. 2,
392-415 (1960).
- 42).- Benzinger, R. Kleber, I. y Huskey, R. J. of Virology 7,
5 (1971).
- 43).- Mandel, M. y Higa, A. J. Mol. Biol. 53,
159-62 (1970).
- 44).- Taketo, A. J. Biochem, 72,
973-79 (1972).
- 45).- Cosloy, S.D. y Oishi, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70,
84-87 (1973).
- 45b).-Oishi, M. y Cosloy, S.D. Biochem. Biophys. Res Comm. 49,
1568-72 (1972).
- 46).- Wackernagel, N. Biochem. Biophys Res. Comm. 51, 2,
306-11 (1973).
- 47).- Clark, J.A. Ann. Rev. Gen. 7,
67-85 (1973).
- 48).- Lieberman, R.P. y Oishi, M. Nature (Lond.) New Biol. 243,
75-77 (1973).
- 49).- Barbour, S.P. y Clark, A.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65,
955-961 (1970).
- 50).- Oishi, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64,
1568-72 (1972).
- 51).- Kushner, S.R., Magaishi, H., Templin, A. y Clark, A.J. Proc.
Natl, Acad. Sci. USA. 68, 824-27 (1971).
- 52).- Low. B. Molec. gen. Genet. 122,
119-30 (1973).
- 53).- Anderson, P.M. y Meister, A. Biochemistry. 4, 12,
2803 (1965).

- 54).- Lowry, O.H., Resebrough, N. J., Farr, A.L. y Randall, R. J., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- 55).- Anderson, R.S., Kemelen, V.M., Jones. C.M. y Patton, J.S. Genet. Res. 11, 119 (1968).
- 56).- Dixon, R.A. y Posgate, J.R. Nature 237, 102 (1972).
- 57).- Richmand, M.H. y Sykes, R.B. Benet, Res. Com. 20, 231 (1972).
- 58).- Merrill, C. R., Geier, M.R. y Petricciani, J.U. Nature 233, 398 (1971).
- 59).- Doy, C.H. Gresshoff, P.M. y Rolfe, B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70, 723 (1973).
- 60).- Mergeay, M., Martín, R. y Remy, J. Arch. Int. Biochem. Physiol. 78, 603 (1970).
- 61).- Sánchez, F.E., Bolivar, F. y Martuscelli, J. (en preparación).
- 62).- Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. y Helling, R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70, 3240 (1973).
- 63).- Chang. A. y Cohen. S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 1030 (1974).
- 64).- Morrow, J., Cohen, S., Chang, A. Boyer, H., Goodman, H. y Helling, R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 1743 (1974).
- 65).- Kono, G. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. (1973).
- 66).- Anderson, P.M. y Meister, A. Biochemistry 5, 10, 3157-63 (1966).
- 67).- Abd-Al Ahmed e Ingraham, J.L. J. Biol Chem. 244, 15 4033-38 (1969).