



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**Regulación de la Expresión de Genes de Resistencia a
Tetraciclina de Plásmidos Naturales**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

PATRICIA LEON MEJIA

1 9 8 3



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.

INDICE

	Pág.
I. ANTECEDENTES	1
II. INTRODUCCION	3
1.1 Origen de la Resistencia	5
1.2 Mecanismo de Resistencia	6
1.3 Estructura y Producción de la Tetraciclina	7
1.4 Mecanismo de Penetración y Modo de Acción de las Tetraciclinas	8
1.5 Mecanismo de Resistencia a la Tetraciclina	10
2. DNA Girasa Estructura y Función	17
III. OBJETIVO	23
IV. SISTEMA EXPERIMENTAL	25
1. Minicélulas	25
2. Plásmidos	26
2.1 Plásmido pSC101	26
2.2 Plásmido R100	27
2.3 Plásmido RP4	30
2.4 Plásmido prSD-1	30
V. MATERIALES Y METODOS	32
VI. RESULTADOS	53
1. Caracterización de las Cepas	53
2. Niveles de Resistencia a la Tetraciclina	53

	Pág.
3. Homología de las Secuencias de DNA de los Diferentes Plásmidos	56
4. Curvas de Crecimiento y Tiempo de Generación de la Cepa P678054 con los Diferentes Plásmidos	58
5. Inducción de la Resistencia a Tetraciclina <u>in vivo</u> con los Diferentes Plásmidos	61
6. Inducción de la Resistencia de Tetraciclina <u>in vivo</u>	64
7. Efecto de la DNA Girasa sobre la Expresión de las Proteínas de la Resistencia a Tetraciclina	72
VII. DISCUSION	84
VIII. REFERENCIAS	97
IX. APENDICE	108

I. ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de los plásmidos, que son moléculas de DNA extracromosomal, superhelicoidal, capaces de replicarse en forma autónoma del cromosoma, éstos han jugado un papel muy importante en el desarrollo de diferentes áreas del conocimiento:

- a) En Medicina, ya que muchas de las resistencias a diferentes tipos de antibióticos en bacterias, se deben a la presencia de este tipo de moléculas, las cuales pueden ser intercambiadas inter e intraespecie.
- b) En la Biología Molecular, en el estudio de la función y estructura del material genético ya que muchos de los avances hechos en esta área en la última década, han sido posibles a través de los plásmidos.
- c) En la Biotecnología que utiliza a la Ingeniería Genética como una herramienta clave.

Los plásmidos presentan dos propiedades que los hacen una herramienta muy útil:

1. En general presentan un tamaño relativamente pequeño, que fluctúa en un rango de 1.5 a 300 megadaltons, lo cual facilita su manipulación in vitro en comparación con el cromosoma.
2. Son moléculas generalmente dispensables para la célula: es decir, la bacteria puede vivir sin ellas y en la mayoría de los casos las funciones codificadas por ellas, como son las resisten

cias a antibióticos, son fácilmente detectables.

En el presente trabajo se estudiaron algunos aspectos de la regulación de la expresión genética de diferentes plásmidos que confieren resistencia tetraciclina (Tc) en la bacteria huésped.

II. INTRODUCCION

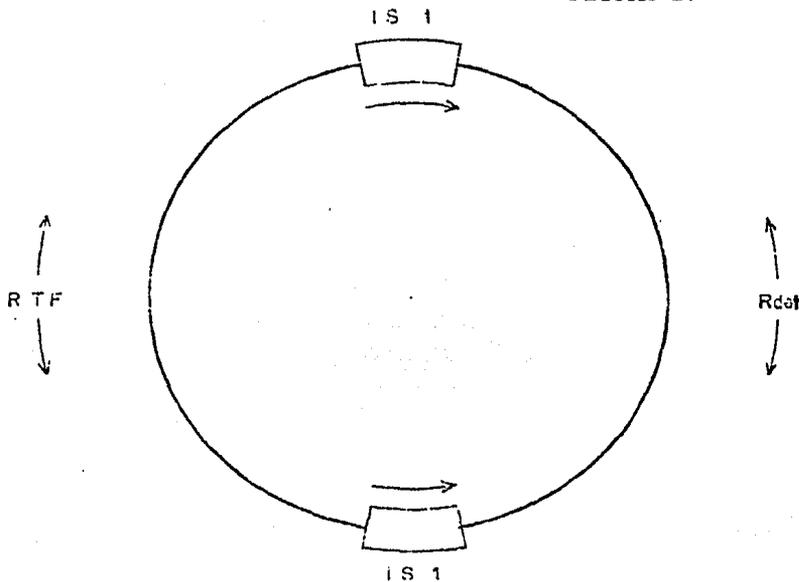
La existencia de plásmidos ha sido detectada en un gran número de bacterias, tanto gram negativas (Escherichia, Salmonella, Proteus, Pseudomonas, etc.) como gram positivas (Estafilococo, Streptococo, Neumococo, etc.). La gran diversidad de plásmidos ha originado que se les agrupe de acuerdo a ciertas características como son: información genética, incompatibilidad, sistema de transferencia, etc.

De acuerdo a la información genética que poseen se les ha dividido en: plásmidos de tipo F, tipo Col, tipo R, etc. En este trabajo nos ocuparemos específicamente de los plásmidos tipo R, los cuales poseen información genética que confiere a la célula huésped resistencia a la acción de diversos antibióticos y/o iones de metales pesados, de donde deriva su nombre (factor de resistencia).

Las infecciones bacterianas han sido una de las mayores causas de enfermedades humanas y de animales. Una proporción importante de éstas son causadas por bacterias de tipo gram negativo, más que por bacterias de tipo gram positivo (1). La introducción de los antibióticos como tratamiento de las enfermedades microbianas, marcó un avance importante en la Medicina; sin embargo, su uso indiscriminado indujo a la aparición de un número creciente de bacterias tanto gram positivas como negativas, resistentes a uno o más antibióticos, debido a la fuerte selección en favor de los organismos resistentes.

Alrededor de 1963, se aislaron por primera vez los plásmidos de tipo R en bacterias gram negativas (Enterobacterias) y se les relacionó con la presencia de la resistencia a los antibióticos de la cepa en estudio (2). El hecho de que las resistencias a las drogas pudieran ser transferidas de una bacteria a otra, se descubrió en 1960 en Japón (3). En algunos casos se demostró que la transmisión por conjugación de la resistencia a varios antibióticos no relacionados era simultánea; es decir, éste se debía a la presencia de un solo plásmido (4). Se ha observado que en los factores "R" que confieren resistencia múltiple, frecuentemente los genes involucrados en ésta se encuentran agrupados en una región llamada determinante de resistencia (r-det), la cuál está flanqueada por secuencias de inserción IS repetidas directas. En general, este r-det se encuentra unido a un segundo elemento llamado factor para la transferencia de la resistencia (RTF), el cual codifica para funciones de replicación, incompatibilidad y transferencia del plásmido (5) (Fig. 1).

FIGURA 1: PLASMIDO TIPO "R"



Origen de la Resistencia

Mucho se ha especulado en cuanto al posible origen de los genes presentes en plásmidos y que confieren resistencia a un gran número de antibióticos. Una de las hipótesis más plausibles que se ha propuesto es la hipótesis de Walker y Walker (6), en la que se sugiere que éstos -- pudieron originarse en los microorganismos productores de antibióticos -- (7). Existen una serie de argumentos que apoyan esta hipótesis, algunos de los cuales se citan a continuación:

Primero, el hecho de que el género de los Streptomycetos, que producen una gran cantidad de antibióticos, presentan un mecanismo de autoprotección al antibiótico que producen.

Segundo, en los Streptomycetos se han encontrado enzimas específicas que inactivan a los antibióticos producidos. Estas enzimas son semejantes a las encontradas en cepas bacterianas con plásmidos de tipo R (7).

Tercero, la presencia de plásmidos en los organismos productores de los antibióticos. Por ejemplo, en una cepa de Streptomycetos productora de tetraciclina, se describió la presencia de un plásmido que codifica para la resistencia de este antibiótico (8).

Por último, el hecho de que los organismos que producen antibióticos coexisten con diferentes bacterias, genera la posibilidad de -- transferencia de material genético por conjugación, transducción o trans

formación, entre estos microorganismos.

En apoyo a esta hipótesis, Watanabe ha sugerido que algunos genes cromosomales pudieron incorporarse a plásmidos RTF promiscuos presentes en la cepa productora (10). No existe, sin embargo, una evidencia contundente que demuestre este tipo de hipótesis, lo cuál deja este campo abierto a una gran cantidad de estudios.

Mecanismos de Resistencia a Antibióticos

Existen dos formas mediante las cuales una bacteria puede adquirir una resistencia a un cierto antibiótico: una, es por la presencia de una mutación espontánea en un gene cromosomal. En general, en este caso existe una modificación del sitio blanco para el antibiótico, de tal manera que éste no puede reconocerlo y actuar en él. La otra, es por la presencia de un plásmido "R". En este caso se sintetizan proteínas específicas que modifican, de alguna manera, la interacción del antibiótico con su sitio de acción. Existen tres mecanismos por las cuales se puede generar la resistencia a los antibióticos por un plásmido "R" (11):

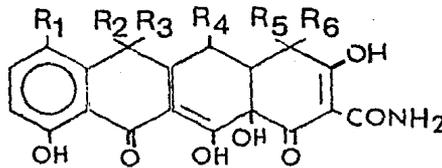
1. Modificación del sitio blanco (resistencia a eritromicina) (12)
2. Modificación química del antibiótico (resistencia a ampicilina, kanamicina, estreptomina, etc.). Este es el mecanismo de resistencia más frecuente.
3. Interferencia con el transporte del antibiótico. Uno de los ejemplos más intrigante y mejor conocido de este mecanismo, es el caso de la resistencia a la tetraciclina, siendo los plásmidos que codifican para esta resistencia sobre los que se basará

el trabajo.

Estructura y producción de la Tetraciclina

La familia de las tetraciclinas, en las que se encuentra la tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina y dimetil-clortetraciclina (Fig. 2) pertenecen al grupo de antibióticos denominados de amplio espectro. Este tipo de antibióticos son muy usados en la clínica. (Figura 2) (13).

FIGURA 2



NOMBRE	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Tc	H	OH	CH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂
Oxi Tc	H	OH	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂
Cloro Tc	Cl	OH	CH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂
Dimetil Cl Tc	Cl	OH	H	H	H	N(CH ₃) ₂
Doxiciclina	H	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂
β-Chelocardina	H	H	CH ₃	H	NH ₂	H
Minaciqlina	N(CH ₃)	H	H	H	H	N(CH ₃) ₂

Las tetraciclinas, al igual que la mayoría de los antibióticos aminoglicosilados conocidos (estreptomicina, neomicina, kanamicina, etc.), son producidas por el género Streptomyces. Entre estos tenemos a Streptomyces rimosus que produce oxitetraciclina, Streptomyces aurofaciens productora de clorotetraciclina y la Tc producida por ambos géneros.

Los tres antibióticos mencionados actúan en forma parecida en las células bacterianas y el efecto fenotípico distinguible es una baja - total de la síntesis de proteínas de la célula sensible a la droga.

Mecanismo de penetración y modo de acción de las tetraciclinas

En la actualidad no existe un modelo consistente que explique la acumulación de la droga en la célula.

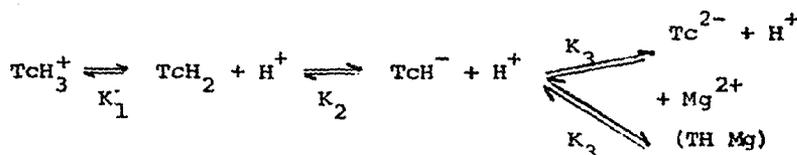
La envoltura celular de las bacterias gram negativas consiste de tres estructuras distintas: la membrana externa, la pared celular y - la membrana interna; entre las dos primeras y la última se encuentra una región denominada espacio periplásmico. Estas bacterias son poco permeables a antibióticos como la penicilina G, la rifampicina, etc. pero muy - permeables a las tetraciclinas.

La Tc penetra a la célula por un transporte activo precedido por un movimiento independiente de energía (14). El movimiento independiente de energía es una difusión del antibiótico a través de los poros - acuosos Ia (de acuerdo a la terminología de Henning) de la membrana externa (15).

Las tetraciclinas son ácidos que en solución producen cuatro formas iónicas diferentes, de las cuales únicamente la forma de la primera disociación es capaz de penetrar a la bacteria (TH_2) (Fig. 3).

Figura 3

Esquema de disociación de la Tc



Una vez que la droga ha penetrado la membrana externa, entra al espacio periplásmico donde se protona e interactúa con la membrana interna. Posteriormente, el antibiótico penetra la membrana interna a través de un transporte activo (16).

Existen tres tipos de transporte activo en E. coli y otras bacterias:

1. Aquellos que requieren ATP como fuente primaria de energía, como el transporte de glutamina.
2. Aquellos en los que existe una modificación enzimática del sustrato durante el transporte, a través de enzimas membranales y citoplásmicas, como el transporte de hexosas.
3. Los que dependen de una fuerza protomotiva que provoca un gradiente electroquímico de iones hidrógeno.

Existen una serie de experimentos contradictorios para tratar de situar el paso de la Tc en alguno de los tipos de transporte activo. - La entrada de Tc es completamente inhibida por arsenato (inhibidor de la síntesis de ATP), cianuro (inhibidor en la citocromo oxidasa) y 2-4 dinitrofenol (disipador de la fuerza protomotriz). Los datos más recientes - concluyen que la fuerza protomotriz, por sí sola, es suficiente para el - transporte de la Tc (16). Otros autores han propuesto que la Tc penetra a la célula utilizando un sistema de acarreadores que se expresan en forma constitutiva, como el transporte activo para magnesio (17) o para los ácidos dicarboxílicos (18). Cualquiera que sea el transporte utilizado, la Tc penetra activamente al interior de la célula donde inhibe la síntesis de proteínas.

Aunque su efecto primario no se encuentra bien dilucidado, se acepta que las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas al impedir la unión del aminoacil-tRNA al sitio A de la subunidad 30S del ribosoma -- (19). Sin embargo, estos antibióticos provocan una multitud de efectos - secundarios, ya que se combinan con iones metálicos esenciales (20) y con compuestos cíclicos, como la riboflavina y el ácido adenílico (21), además de inhibir el transporte de electrones (22).

Mecanismo de resistencia a la Tetraciclina

El mecanismo más común de resistencia a los antibióticos determinado por plásmidos, es la modificación química del antibiótico por - la presencia de enzimas específicas, como son: acetil transferasa, hidrolasas, fosfotransferasas, etc. (7). Sin embargo, como ya se mencionó, el

mecanismo de resistencia para las tetraciclinas no actúa de esta forma; en este caso, ni el antibiótico ni el sitio blanco son modificados.

La resistencia a la Tc está determinada por un gran número de plásmidos naturales. Esta resistencia es inducible: es decir, las bacterias incrementan su nivel de resistencia a la Tc si se les expone previamente a dosis subinhibitoria del antibiótico (23). La resistencia se expresa por un decremento en la acumulación del antibiótico en el interior de la célula; este decremento se origina por una disminución de la permeabilidad de las células a las tetraciclinas (24). Levy *et al.* (25), llegaron a la conclusión de que el mecanismo de resistencia parece estar asociado con la habilidad de las cepas resistentes a "bombear" al antibiótico hacia el exterior de la célula. Este mecanismo es efectivo y reduce la concentración del antibiótico dentro de la célula a nivel más bajo que la concentración necesaria para que la asociación ribosoma-antibiótico pueda llevarse a cabo.

El mecanismo de resistencia a las tetraciclinas no ha sido aún bien definido a nivel molecular; sin embargo, se sabe que la concentración intracelular del antibiótico es menor en las células resistentes que en las sensibles. Esto se debe, al parecer, tanto a una disminución de la permeabilidad de las células al antibiótico, como a una expulsión activa del mismo por la célula. Algunos autores proponen que además de estos mecanismos existe un tercer modo de protección, el cual impide la interacción de las pocas moléculas presentes dentro de la célula con los ribosomas (25).

El mecanismo de resistencia involucra la síntesis de proteínas específicas, las cuales al parecer se encuentran reguladas negativamente y son las responsables del fenómeno de resistencia.

El estudio de diferentes plásmidos que confieren resistencia a Tc ha mostrado fuertes diferencias entre algunos de estos, lo cual ha originado que se proponga varias clasificaciones.

Chabbert (26) clasificó a los factores de resistencia a Tc -- en dos grupos, dependiendo de su comportamiento frente a la minociclina, que es una nueva clase de Tc semi-sintética con una actividad mayor que -- otros antibióticos de esta familia.

1. Grupo Tet A, el cual es asignado a aquellos factores que determinan una resistencia media a la Tc y una baja resistencia a la minociclina.
2. Grupo Tet B. Dentro de este grupo se tienen a los plásmidos que determinan un alto nivel de resistencia a la Tc y una resistencia moderada a la minociclina.

El incremento del nivel de resistencia durante la inducción -- es mayor para los plásmidos pertenecientes al grupo Tet A que los del grupo Tet B. La minociclina, a diferencia de la Tc, es un mal inductor de -- la resistencia (27).

McMurray, propuso otra clasificación para los factores de -- resistencia a la Tc. Esta clasificación se basa en el nivel de resistencia de los plásmidos al antibiótico, proponiendo cuatro grupos (28).

La última clasificación que se ha propuesto y que reúne a las anteriores, es la clasificación de Méndez et al. (29). En esta clasificación los plásmidos se agrupan no solo por el nivel de resistencia que determinan, sino por similitud genética determinada por estudios de hibridación DNA-DNA. Con base en las diferencias a nivel genético y reuniendo las encontradas con anterioridad: nivel de resistencia a Tc y comportamiento frente a la minociclina, se propusieron cuatro clases. Dentro de tres de estas clases se encuentra la mayoría de los plásmidos que confieren resistencia a la Tc, con excepción de uno, el RAL, el cual fue colocado en la cuarta clase, ya que no comparte características de ninguna de las anteriores.

Las cuatro clases propuestas por Méndez et al. son:

1. Clase A. Dentro de esta clase se encuentran plásmidos que expresan baja resistencia a la Tc y poca o ninguna resistencia a los análogos del antibiótico, minociclina y chelocardina. Estos de terminantes corresponden al grupo Tet A de Chabbert.

Dentro de esta clase se incluyen plásmidos que presentan un com portamiento diferente a otros plásmidos de esta clase frente a la chelocardina, por lo que se les colocó en una subclase de la clase A.

2. Clase B. Plásmidos que se incluyeron dentro de esta clase expresan una resistencia igual a los análogos de la Tc que la Tc misma (Grupo Tet B de Chabbert).

Dentro de esta clase existen determinantes con comportamiento fenotípico diferente a la clase en cuanto al nivel de resistencia a Tc, por lo que éstos son colocados dentro de una subclase de la clase B.

3. Clase C. esta compuesta por plásmidos que determinan baja resistencia a la Tc y sensibilidad a los análogos del antibiótico.
4. Clase D. Un sólo plásmido: RAI. Este plásmido determina alta resistencia a Tc.

La no hibridización del material genético del plásmido pertenecientes a clases diferentes involucradas en la resistencia a la Tc implica que plásmidos pertenecientes a una clase, codifican para productos no especificados por plásmidos de otro grupo.

La clasificación y algunas características de la misma se muestran en la Tabla I.

A pesar de las diferencias antes mencionadas, algunos plásmidos pertenecientes a clase diferentes, codifican para proteínas de peso molecular, función y localización celular semejante.

Durante la inducción de la resistencia, se sintetizan una o más proteínas membranales. Una de estas proteínas inducibles de membrana interna se ha denominado proteína TET, y es posiblemente la proteína más importante en el fenómeno de la resistencia al antibiótico en los plásmidos pertenecientes a la clase B. El peso molecular de la proteína TET es de 36 Kd y su función parece relacionarse con el fenómeno de exclusión de

TABLA I

CLASIFICACION DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA A TETRACICLINA

Clase	Plasmido	Resist a tc ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Resistencia a analogos ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		Plasmido prototipo	Homologia con el marcador Tcr
			minoc	chelo		
A	RP4, RP1 R446b, pIP15 pIP7, pIP113	$>75 \leq 150$	$\geq 5 > 10$	< 5	RP1	Fragmento SmaI de RP1 (750 pb)
A1	R386, N3	75	$\geq 5 < 10$	$\geq 5 < 10$	R386	
B	R222, pIP67 R136, R455 R688, R7 R621a, R724	$\geq 150 \leq 200$	≥ 10	≥ 5	R222	Fragmento de Hind III de Tn 10 (4485 pb)
B1	R725, R27	$\geq 50 \leq 100$	$\geq 5 < 10$	$\geq 5 < 10$	R27	
C	pSC101, R144 SP219, pRI20	≤ 25	< 5	< 5	pSC101	Fragmento de BSTN1 de pBR322 (780 pb)
D	RA1	100	< 5	< 5	RA1	No son de clase A, B o C

la Tc de la célula (30). Proteínas TET de 34 Kg de peso molecular, función y localización semejante, son codificadas por determinantes pertenecientes a las dos clases restantes (31). Este tipo de semejanza ha sido encontrado también para otras proteínas involucradas en la resistencia a Tc determinada por plásmidos pertenecientes a diferentes clases.

A pesar de que las diferentes secuencias de DNA implicadas en el fenómeno de resistencia parece no tener un origen común y haber evolucionado separadamente una de otra, existe una clara convergencia evolutiva entre ellas, ya que sus productos actúan de manera semejante.

Esta aparente convergencia evolutiva suscitó nuestro interés para tratar de conocer algunos aspectos sobre la regulación de la resistencia a Tc en diferentes plásmidos.

Existen diferentes niveles de regulación de la expresión genética que pueden ser abordados. Uno de ellos es una posible regulación dependiente del estado de superenrollamiento del DNA (32). Existen datos interesantes a este respecto, en los que se ha visto que dependiendo de este estado algunos genes específicos pueden modular su nivel de transcripción, e incluso algunos genes que han sido relajados no pueden ser transcritos los cuales hacen suponer que este mecanismo es importante para la expresión genética.

Resultaba importante el estudiar este nivel de regulación sobre la expresión de los genes de resistencia a Tc en diferentes plásmidos y observar si existía alguna semejanza entre ellos.

Existen varias hipótesis sobre el papel que desempeña el estado de superenrollamiento del DNA para la transcripción, una de ellas es - que algunas regiones promotoras de genes puedan ser abiertas (complejo de iniciación) más fácilmente, sólo si se encuentran superenrolladas.

En los siguientes párrafos abordaremos algunos aspectos sobre la estructura tridimensional del DNA y su posible intervención en la regulación.

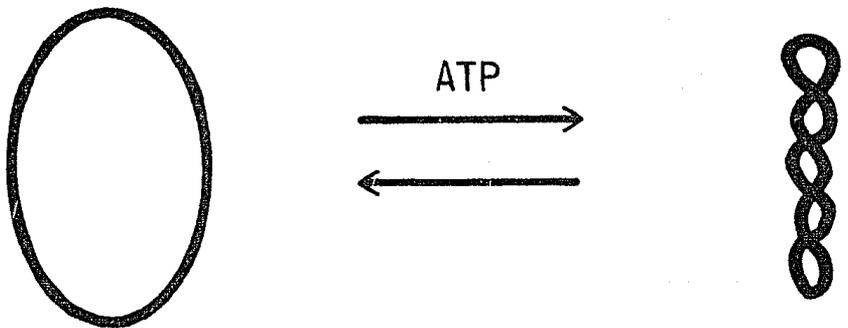
DNA Girasa Estructura y Función

La DNA girasa o topoisomerasa II cataliza el superenrollamiento negativo del DNA circular cerrado de doble cadena, en una reacción dependiente de energía como se ve en la Fig. 4.

La girasa pertenece al grupo de enzimas denominadas TOPOISOMERASAS, que tienen como sustrato al DNA, dando lugar a conformaciones secundarias de otros órdenes (33).

El DNA, tanto de organismos procariontes como de eucariontes se encuentra normalmente superenrollado. En los primeros este superenrollamiento es negativo; es decir, en dirección opuesta a la doble hélice, dando un giro aproximadamente cada 15 vueltas de la hélice Watson Crick (Forma B del DNA); este superenrollamiento al parecer alivia la tensión

Fig. 4.- REACCION CATALIZADA POR LA TOPOISOMERASA II
(DNA GIRASA)



generada por la estructura tridimensional del DNA (34).

La DNA girasa es la única topoisomerasa conocida en procariontes que cataliza el superenrollamiento del DNA (35). Esta enzima esta -- aparentemente conservada aún en eucariontes ya que se han encontrado enzimas semejantes (36). La girasa es una enzima tetramérica, con un peso -- molecular de 400 Kd compuesta de dos subunidades diferentes (dos subunidades A y dos B) $\alpha_2 \beta_2$. La subunidad A, que pesa 105 Kd. esta codificada -- por el gene gyrA (nalA). Esta subunidad cataliza las reacciones de corte y reunión del DNA y determina la sensibilidad de la célula a los ácidos -- nálidixico y oxolínico. La subunidad B es una proteína de 95 Kd., codificada por el gene gyrB (couB) y media las actividades que requieren la presencia de ATP ya que es una ATPasa. Esta subunidad controla la sensibilidad a coumermicina A1 y a la novobiocina (37).

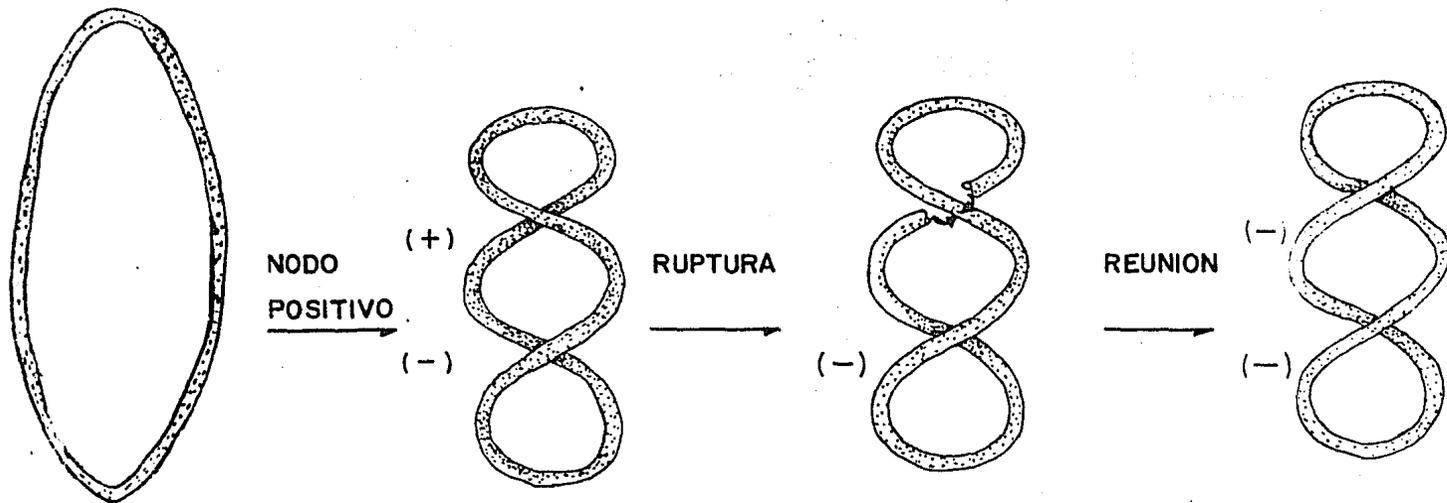
La reacción de superenrollamiento presenta dos componentes: -

- a) un proceso dependiente de ATP, el cual reduce el número de cruzamiento (linking number) (38), introduciendo un superenrollamiento negativo en el DNA circular duplex.
- b) una reacción de corte y cierre que resulta en el relajamiento de la -- molécula de DNA en ausencia de ATP.

El modelo más reciente que explica el superenrollamiento ne-- gativo del DNA, es el mecanismo de inversión de signo (39). En este modelo se postula que la DNA girasa introduce vueltas tanto positivas como negativas; posteriormente las vueltas de signo positivo son pasadas al signo negativo por medio de un corte de doble cadena como se puede ver en la Figura 5.

Fig. 5

INVERSION DE SIGNO



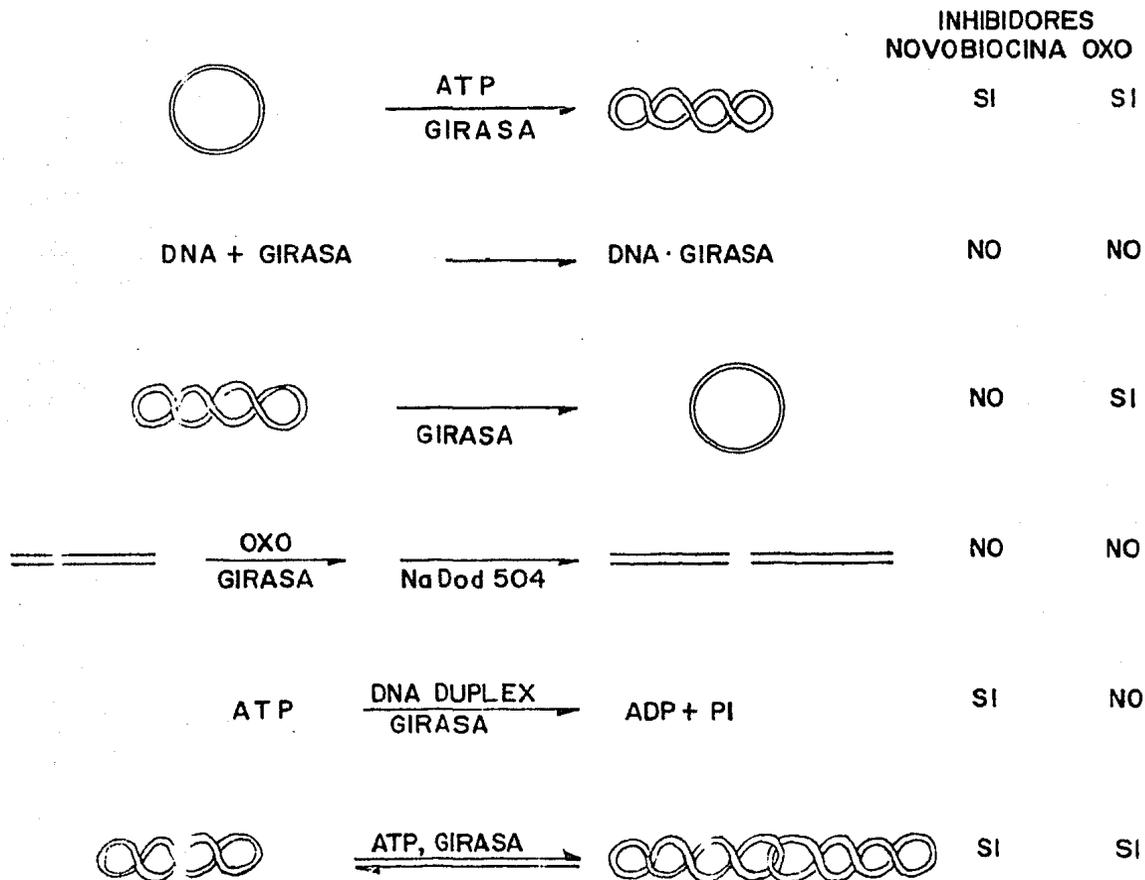
Existen inhibidores específicos para cada una de las subunidades de la DNA girasa y aunque todos ellos provocan el relajamiento del DNA; funcionalmente son diferentes. El ácido nalidíxico y el ácido oxolínico actúan sobre la subunidad A relajando el DNA; como efecto colateral provocan cortes en el DNA. La coumenmicina y la novobiocina inhiben la subunidad B y como consecuencia existe un relajamiento del DNA -- (40). En E. coli, la DNA girasa cataliza una reacción adicional que es la concatenación y desconcatenación del DNA al efectuar cortes de doble cadena en la molécula de DNA.

Las actividades de esta enzima y de los inhibidores se ven en la Figura 6.

La DNA girasa se encuentra involucrada en varios procesos -- celulares, entre ellos tenemos: superenrollamiento del cromosoma (41), replicación (42), reparación (43), transposición (44), transcripción -- (45), etc.

En las bacterias, la mayoría de la regulación de la expresión genética que ocurre a nivel de transcripción, se debe a proteínas -- reguladoras (represores o activadores), a catabolitos que interaccionan con el DNA o con las proteínas regulatorias. Sin embargo gran cantidad de estudios in vivo (46) e in vitro, han mostrado que los inhibidores de la girasa interfieren selectivamente con la expresión de algunos genes -- (47). Se ha encontrado que algunos genes se ven altamente afectados al inhibir la girasa mientras que otros no, siendo clasificados como genes dependientes o independientes de girasa. Esta dependencia o independencia al parecer responde a características del propio gen y puede ser ex-

Fig. 6.- ACTIVIDADES DE LA DNA GIRASA



plicada por el contenido de A-T y G-C en la zona de iniciación de la --
transcripción, de tal manera que genes ricos en A-T son independientes -
en comparación con los ricos en G-C (47). Otra posible explicación es -
la propuesta por Sanzay (46) en la cual se propone que la relajación del
DNA modifica la interacción RNAPolimerasa- DNA en promotores sensibles a
represión catabólica.

III. OBJETIVO

El fenómeno de resistencia a antibióticos por plásmidos es muy estudiado; no solo porque médicamente es de gran importancia, sino porque el fenómeno en sí abre una puerta hacia el conocimiento de mecanismos desconocidos.

La resistencia de las bacterias hacia el antibiótico Tc ha sido ampliamente estudiada, ya que a diferencia de otras resistencias en plásmidos ésta es sumamente compleja, tanto por el número de determinantes que han coevolucionado, como por el número de proteínas involucradas en ella.

El estudio de este mecanismo de resistencia ha sido extenso en lo que se refiere a las diferentes proteínas inducidas, a los niveles de resistencia y a su comportamiento frente a análogos del antibiótico; sin embargo, queda un gran número de preguntas por resolver. Existe toda una serie de aspectos que aún no han sido abordados en lo que se refiere a los fenómenos de regulación de la resistencia que ha llamado nuestra atención. El objetivo general de este trabajo es el estudio de algunos mecanismos regulatorios de genes involucrados en la resistencia a Tc en diferentes plásmidos.

Como se mencionó, el estado de superenrollamiento del DNA -- puede ser visto como un nivel más de regulación de la expresión genética y se tiene la evidencia de que un gel involucrado en la resistencia a la Tc en un plásmido construido in vitro (pBR322) depende para su expresión

de girasa (48). Esto ha motivado nuestro interés para llevar a cabo un estudio más completo sobre la influencia de la DNA girasa en la expresión de los genes de resistencia a Tc de plásmidos naturales pertenecientes a las diferentes clases propuestas por Méndez et al. (Tabla I).

Este estudio pretende determinar si existe alguna similitud en la regulación a nivel de la superestructura del DNA, a través de la expresión de las diferentes proteínas involucradas, ya que si bien la secuencia de DNA es diferente, las características de éstas, como se men-cionó, son semejantes.

VI. SISTEMA EXPERIMENTAL

El sistema experimental usado fué el de minicélulas (49) que son "células" carentes de cromosoma que derivan de la región polar de la célula productora por una división aberrante. Se han encontrado cepas - mutantes productoras de minicélulas en varias especies bacterianas como E. coli (50), S. typhimurium (51), Bacillus subtilis (52) y Hemophylus - influenzae (53). Las cepas productoras de minicélulas en E. coli derivan de la cepa P678-54, la que presenta dos mutaciones cromosomales: -- minA y minB (50).

Las minicélulas se producen en forma continua durante el crecimiento de la cepa productora, pero su producción aumenta durante la fase estacionaria del cultivo. Estas "células" tienen un tamaño pequeño - (0.70 μ) en comparación con las células normales (2.8 x 0.80 μ), lo que facilita su purificación. Las minicélulas conservan, a excepción del -- cromosoma, todas las características de la célula de donde derivan: pared celular, membrana celular, ribosomas, RNA, proteínas y sistema de generación de energía; son células móviles con una vida media de 48 horas.

Una de las características más notables de las minicélulas, es que a ellas se segregan los plásmidos presentes en la célula progenitora, los cuales pueden ser estudiados sin la interferencia del cromosoma (54). Existen plásmidos que prácticamente no se segregan a las minicélulas como son F' y el fago P1, probablemente debido a que éstos se encuentran asociados al cromosoma de la célula (49). Las minicélulas, al

igual que la célula de donde derivan, tiene la capacidad de conjugación y pueden ser infectadas por fagos.

Todas estas características han sido ampliamente utilizadas para estudiar diferentes fenómenos: división celular, distribución de -- macromoléculas (55), transcripción, traducción, conjugación (56), estructura de la pared celular. Las minicélulas se utilizan también para estudios de expresión genética de plásmidos naturales o recombinantes (57).

Para nuestros propósitos las minicélulas resultan ser un sistema muy útil, ya que a través de éste es posible observar la expresión -- diferencial de los plásmidos involucrados en la resistencia a la Tc, sin la interferencia de las proteínas codificadas por el cromosoma. De los sistemas que existen para este tipo de estudios: Zubay (58), maxicélula--- (59), y minicélulas, este último es el más fácil de manejar y el que más se acerca a las condiciones in vivo.

Plásmidos

Los plásmidos utilizados se enumeran en la Tabla III, cada -- uno de ellos pertenece a una clase diferente (Tabla I) y sus características se describen a continuación:

1. Plásmido pSC101. Este plásmido fué considerado por mucho tiempo un derivado, del plásmido R-65 por técnicas de manipulación in vitro (60); sin embargo, al parecer pSC101 es un plásmido -- natural anteriormente denominado SP219 (61).

El plásmido pSC101 codifica para cuatro polipéptidos involucrados en la resistencia a Tc; de los cuales, uno se sintetiza constitutivamente y tres son inducibles con Tc (62):

- a) Polipéptido de 34 Kd. Es una proteína inducible de membrana interna, cuya función se relaciona con el bloqueo de la entrada del antibiótico a la célula. Es una de las proteínas más importantes, ya que por sí sola puede conferir el fenotipo de resistencia de la célula al antibiótico (63).
- b) Polipéptido de 24 Kd. Es una proteína membranal inducible, su función se desconoce hasta la fecha. Sin embargo, su ausencia no altera la resistencia a la Tc por lo que se concluye que no es necesaria para ésta (64).
- c) Polipéptido de 18 Kd. Es una proteína de la membrana interna, su expresión es constitutiva e interviene, al igual que la proteína de 34 Kd, en la baja de la permeabilidad de la células al antibiótico.
- d) Polipéptido de 14 Kd. Esta proteína es inducible y reduce la unión rápida dependiente de ATP de la Tc a la célula.

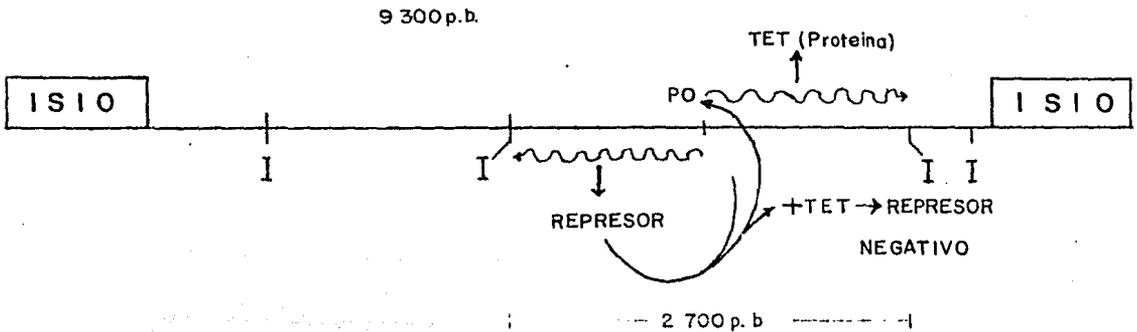
Se ha propuesto además la existencia de un polipéptido represor de 36 Kd (65) (Apéndice 1).

2. Plásmido R100. Este plásmido pertenece a los tipo "R" multiresistentes. La resistencia a la Tc en este plásmido se encuentra en el RTF, separada de todas las demás resistencias. Esta

resistencia se localiza en el transposón Tn10 (66). Un transposón es una secuencia de DNA, la cual puede transferir una copia de ella, como una unidad discreta a otro sitio del DNA (cromosoma, plásmido o fago). Esta transferencia no utiliza el sistema de recombinación generalizada dependiente del gen recA de la célula sino que se lleva a cabo por un sistema denominado de recombinación ilegítima el cual necesita de homología mínima para funcionar (67). El Tn10 es un transposón de 9,300 pb dentro de las cuales se incluyen tres secuencias (68): una secuencia única de 6,500 pb con la información necesaria para la resistencia de a la TC y dos secuencias invertidas repetidas de 1,400 pb llamadas IS1-0, dentro de las cuales se encuentran incluidas todas las funciones necesarias para la transposición (69). Estas secuencias flanquean a la secuencia única como se ve en la Figura 7.

FIGURA 7.

ESTRUCTURA DEL Tn 10



La frecuencia de transposición calculada para el Tn10 es de un evento por cada 10^6 células; es decir, de 10^{-6} (70). Una propiedad interesante de este transposón, es que cuando los genes involucrados en la resistencia se encuentran presentes en plásmidos multicopia (más de dos copias/cromosoma) el nivel de resistencia expresado disminuye cerca de diez veces con respecto al determinado por un Tn10 en estado monocopia (150 $\mu\text{g/ml}$). Esto se ha explicado por una sobreproducción de represor (71) o bien por una regulación que impide la expresión excesiva de la proteína TET (72).

En el plásmido R100 han sido reportadas tres proteínas inducibles con Tc cuyos pesos moleculares son de 36, 25 y 15 Kd respectivamente:

- a) La mayor de estas proteínas (36 Kd), ha sido llamada proteína TET, se localiza en la membrana interna y su función al parecer es bloquear la entrada del antibiótico a la célula disminuyendo la permeabilidad de la membrana. Esta proteína se encuentra regulada negativamente por un represor que es inactivo en presencia de Tc (73).
- b) La proteína de 25 Kd ha sido identificada como la proteína represora (Tet R) de la proteína TET (74).

La regulación de este sistema es sumamente compleja, ya que la proteína Tet R, en ausencia de Tc, reprime a la proteína TET y a su propio producto, pero su síntesis es inducida con la presencia del antibiótico. Es una proteína membranal y deleciones de su gen estructural disminuyen el nivel de resistencia de la célula, lo que demuestra que ade

más de ser represor, interviene directamente en la resistencia.

c) La proteína de 15 Kd, reportada por Yang (75), se observa única mente en minicélulas que contienen R100, por lo que se propone que posiblemente este codificada por una región del R100 fuera del Tn10. Su función se desconoce (76).

3. Plásmido RP4. Este plásmido proviene de Pseudomona aeruginosa. Aunque ha sido ampliamente usado para estudios genéticos, no se tiene ninguna información acerca de las proteínas codificadas - por este plásmido relacionadas con la resistencia a Tc.

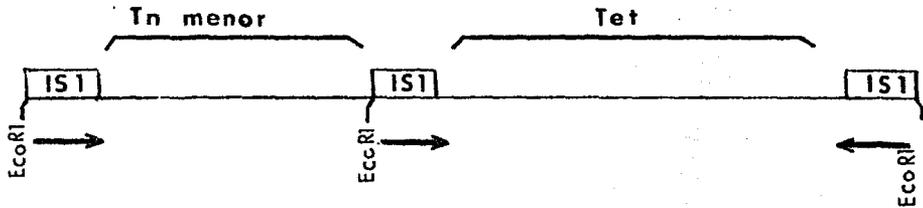
Recientemente se reportó que la región involucrada en la resistencia a Tc de este plásmido es la misma que la encontrada en - el pRSD1 (77) que pertenecen a la misma clase

4. Plásmido pDSD1. Este plásmido que confiere resistencia a Tc, - fué aislado en E. coli donde se demostró que pertenecía a la mis ma clase que RP4. Es un plásmido en el cual el nivel de resistencia se incrementa aproximadamente diez veces si es previame te inducido (78). En condiciones de presión fuerte, con altas concentraciones del antibiótico, han sido aisladas moléculas con la región de resistencia amplificada (región TET). Esta amplifi cación se lleva a cabo por recombinación, dando lugar a moléculas que contienen la región TET repetida hasta siete veces, por lo que el nivel de resistencia al antibiótico se incrementa (79).

La resistencia a la Tc en este plásmido se encuentra localizada - en el transposón Tn 1721 de 11.4 Kb (79). Este transposón contie

ne dos secuencias invertidas repetidas de 38 pb que lo flanquean y una tercera idéntica a las anteriores, que separa a la región de la resistencia de lo que se ha llamado el transposón menor - (79) (Figura 8).

FIGURA 8 TRANSPOSON Tn1721



V. MATERIALES Y METODOS

1. Cepas Bacterianas y Plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo, se muestran en las Tablas II y III respectivamente.

2. Medios de Cultivo

- a) Medio Luria. Bactotripton 10 g; extracto de levadura 5 g; --
NaCl 10 g; agua destilada a 1 litro; pH 7.2 ajustado con NaOH 2.5 N.
- b) Medio Fry. Extracto de carne 10 g; bactopectona 5 g; NaCl --
10 g; agua destilada a 1 litro.
- c) Medio Mc. Conkey. Medio Mc.Conkey 50 g en 1 litro de agua destilada.
- d) Medio Mínimo (M.M.). KH_2PO_4 3 g; NH_4Cl 1.9 g; Na_2PO_4 6 g; --
NaCl 0.5 g, agua destilada a 1 litro. Esterilizar y añadir MgSO_4 (25%) 1.0 ml; azúcares (20%) -
10 ml; tiamina (0.1%) 0.16 ml.

Los aminoácidos requeridos se añaden a una concentración final de 20 µg/ml.

- e) M.M. suplementado con casaminoácidos (M.L.). La solución con --
las sales se prepara por separado a una concentración 10 veces -
mayor:

TABLA II
CEPAS UTILIZADAS

Cepa	Plásmido	Marcadores del plásmido	Marcadores cromosomales	Fuente
1) J53	N-3	Tc, Sm, Sp, Su, Hg	Pro ⁻ , Met ⁻ , ^r	Plasmid Ref. Center
2) J53	RP4	Tc, Ap, Km, Nm	Pro ⁻ , Met, ^r	Plasmid Ref. Center
3) X984	R100	Tc, Cm, Sm, Sp, Su, Hg, F ⁻	T6 ⁵ , <u>min A</u> <u>min B</u> , <u>purE</u> , <u>pdxC</u> , His ⁻ Sp ^R , T3 ^R , <u>cycA^R</u> <u>cycB^R</u> , <u>xye⁻</u> , Met ⁻ , <u>ilv⁻</u>	S.B. Levy
4) RN45	pRSD-1	Tc	Lac ⁻ , Leu ⁻ , Thr ⁻ , Thy ⁻ , <u>TonA</u> , <u>SupE</u> , <u>nalA</u>	R. Schmitt
5) P6788-54	--	--	<u>thr1</u> , <u>leu6</u> , <u>lac Y1</u> , <u>min A</u> , <u>min B2</u> , <u>rps L135</u> , <u>SupE 44</u> , <u>thy-1</u>	Bolfvar
6) P678-54	pBR322	Tc, Ap	"	Este trabajo
7) P678-54	pSC101	Tc	"	Willets
8) P678-54	R100	Cm, Sm, Tc, Sp, Su, Hg	"	Este trabajo
9)	RP4	Tc, Sp, Km, Nm	"	Este trabajo
10)	pBR322	Tc	"	Este trabajo
11)	N-3	Tc, Sp, Sm, Su, Hg	"	Este trabajo
12) NK6641	-	--	<u>recA56</u> , <u>lac pro XIII</u> , Su ⁻ , Sp ^R , ^r	Nancy Kleckner
13) NK5830	F lac	i [°] L8 pro ⁺ , lac ⁺	Su ⁻ , <u>recA56</u> , Arg ⁻ , <u>lac proXIII</u> , Nal ^R , Rif ^R	Nancy Kleckner
14) NK5830	F lac/pNK61	i [°] L8 pro ⁺ , lac ⁺ Tc Sp	Su ⁻ , <u>recA56</u> , Arg, <u>lac proXIII</u> , Nal ^R -- Rif ^R	Este trabajo

1
33
1

TABLA III
PLASMIDOS UTILIZADOS

Plasmido	Huésped original	Fenotipo/genotipo	p.M. (Mdal)	Copias/cromosoma	Fuente
1) pSC101	Salmonella sp	Tc	5.8	6-8	Willets
2) R100	Salmonella flexneri	Tra ⁺ , Fi ⁺ (F), Dps, Au, Fa, Sm, Sp, Su, Tc, Hg	70	1-2	S. Levy
3) RP4	Pseudomona aeruginosa	Tra ⁺ , Sps, Fi ⁻ , Ap Km, Nm, Tc	36	1-3	P. Ref. Center
4) pRSD1	Escherichia coli	Fi ⁻ (F), Tc	30	2-3	Schmitt
5) N-3	Shigella sp	Tra ⁺ , Dps, Fi(F), Sm, Sp, Tc, Hg, HspII	33	1-2	P. Ref. Center
6) pBR322	<u>in vitro</u>	Ap. Tc	2.8	35	Bolívar
7) pNK81	<u>in vitro</u>	Tc(Tn10), Ap	9.0	--	N. Kleckner

Sales 10X

NH_4Cl 25 g

NH_4NO_3 5 g

Na_2SO_4 10 g

K_2HPO_4 45 g

KH_2PO_4 15 g

Agua destilada a 500 ml

Para preparar 1 litro de medio mínimo completo se mezclan:

Sales 10X 100 ml

Agua destilada 850 ml

Se esterilizó y se agregó: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (25%) 0.4 ml; tiamina - (0.1%) 0.08 ml.; glucosa (20%) 25 ml; casaminoácidos (20%) 25 ml y los aminoácidos requeridos a una concentración final de --- 20 ug/ml.

- f) Agar blando. Agar 7 gr.; NaCl 8 gr.; luria 30 ml; agua destilada a 1 litro.
- g) Medio de conservación. Caldo nutritivo 1 g; NaCl 800 mg; triptofano 0.20 g; agar 600 mg; agua destilada a 1 litro.
- h) Medio sólido. Se agregaron 20 g de agar por litro de cultivo para los medios descritos.
- i) Antibióticos. Los antibióticos usados en este trabajo y la con--- centración de éstos fueron: ampicilina 200 $\mu\text{g/ml}$; estreptomycin 50 y 200 $\mu\text{g/ml}$; tetraciclina 5 y -- 25 $\mu\text{g/ml}$; kanamicina 25 $\mu\text{g/ml}$; cloramfenicol -- 25 $\mu\text{g/ml}$ espectinomycin 25 $\mu\text{g/ml}$; sulfadiazina - 50 $\mu\text{g/ml}$.

3. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de las siguientes -
casas comerciales:

- a) Bio-Rad Lab., USA: Agarosa, azul de Coomassie, β -mercaptoetanol, persulfato de amonio, poliacrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sodio (SDS), TEMED (N,N', -- N'-tetrametildiamina)
- b) Difco, USA: Extracto de carne, caldo nutritivo, medio McConkey agar, triptona, extracto de levadura, peptona, casaminoácidos.
- c) Schlecher and Schuell. Filtro de hibridización.
- d) Merck, S.A. Prolina, Leucina, formamida, dimetil-sulfoxido -- (DMSO), 2,5, difeniloxazol (PPO), urea.
- e) Pharmacia, USA: Sephadex G 25
- f) New England Nuclear, USA: [³⁵S] Metionina, [³²P α] CTP
- g) Sigma de México: Bromuro de Etidio, ficol 6000, antibióticos, aminoácidos, polivinilpirrolidona, EDTA, tris, HCl.
- h) Baker: Sales, azul de bromofenol, todos los demás.

METODOLOGIA

1. Metodología Básica

- 1.1 Siembra en medio sólido. Las bacterias se sembraron sobre medio -- sólido utilizando cuatro métodos:

- a) Siembra por estría. Las bacterias se distribuyeron sobre la caja de Petri con un asa de cultivo.
- b) Siembra por parchado o replicado. Este método se utilizó para probar los diferentes marcadores genéticos de una cepa bacteriana. Consiste en tomar colonias aisladas con un palillo estéril y sembrar en medio Luria sólido, las cajas se incubaron hasta tener crecimiento visible, posteriormente se transfirieron a otras cajas por medio de un terciopelo estéril.
- c) Siembra por espatulado. La suspensión bacteriana (0.1 ml) se colocó sobre la caja de Petri y se distribuyó con una espátula de vidrio.
- d) Siembra por vaciado. Se mezcla 0.1 a 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 3 ml de agar blando licuado y se vertió sobre cajas de medio sólido distribuyéndolo homogéneamente.

1.2 Cultivo en líquido. Para el cultivo en líquido se inocularon 10 ml de caldo Luria con 0.2 ml de un cultivo estacionario de la cepa -- requerida. El cultivo se incubó a 37°C con agitación en un matraz nefelométrico. La progresiva turbidez del cultivo se cuantificó -- periódicamente en unidades de densidad óptica a 550 nm utilizando un espectrofotómetro Bauch & Lomb.

1.3 Conservación de las cepas. Las diferentes cepas utilizadas se conservaron a 4°C usualmente en cajas de Petri con el medio adecuado. Bajo estas condiciones, las cepas deben ser resembradas frecuentemente (cada tres semanas aproximadamente).

Otros métodos de conservación utilizados fueron:

- a) Conservación en medio sólido; en el cual la cepa que se quiere preservar, previamente estriada en medio fresco, se sembró por piquete en el medio de conservación. Estos se conservaron a temperatura ambiente.
- b) Conservación en glicerol; en el cual se mezcló 1 ml de un cultivo estacionario en Luria de la cepa y 1 ml de glicerol estéril al 80%. La conservación se hizo a -20°C .

Las cepas que contienen transposones, se conservaron en glicerol al 40% a -70°C .

2. Construcción de las cepas

Los plásmidos utilizados en el trabajo fueron transferidos - de su cepa original a la cepa P678-54 productora de minicélulas. Esta - transferencia fué hecha por dos métodos: los plásmidos movilizables -- (pRSD1, R100, N-3 y RP4) se transfirieron por conjugación y los plásmi-- dos no movilizables (pBR322, pSC101, y pNK81), por transformación (Tabla II).

La construcción de la cepa NK5830/Flac-pNK81 fué hecha a par-- tir de la cepa NK5830/F lac. El plásmido pNK81 se introdujó por trans-- formación, utilizando el DNA del plásmido que fué generosamente donado - por N. Kleckner. (80).

2.1 Método de conjugación. Se hicieron conjugaciones a tiempos largos, siguiendo básicamente el método de Miller (81):

- a) Tanto la cepa receptora como la donadora se crecieron por separado hasta la fase estacionaria.
- b) Se mezcla en una proporción de diez veces más cepa receptora - (10 ml) que cepa donadora (1 ml).
- c) Se incuba a temperatura ambiente, sin agitación, durante 18 -- horas.
- d) Se estría en una caja con el medio sólido adecuado. Posteriormente, el fenotipo de las exconjugantes se prueba por parchado. En el caso del N-3 se observó que este no conjugaba eficiente-- mente bajo las condiciones descritas, por lo que se efectuaron algunas modificaciones. En este caso la conjugación se hizo -- sobre medio sólido, lo que permitió un mejor contacto entre la cepa donadora y receptora:
 - i) Ambas cepas se crecen en la forma descrita.
 - ii) Los cultivos se mezclan a la proporción descrita, y se fil tran a través de un filtro milipore HAWP 02500 de 0.45 um.
 - iii) El filtro se incuba sobre medio sólido Luria, toda la no-- che a 37°C.
 - iv) Se translada a medio Luria con 1 µg/ml de Tc y se incuba - por tres horas para inducir la resistencia.
 - v) El filtro se raspa y estría con el medio selectivo.

2.2 Transformación de cepas de E. coli

El método de transformación utilizado fué el descrito por -- Cohen et al. (82) con algunas modificaciones:

- a) 10 ml de cultivo con células en fase exponencial a 0.4 O.D. -- 550 nm (aproximadamente 4×10^8 células por ml se centrifuga a 10,000 rpm por 5 min a 4°C.
- b) La pastilla se lava con una solución de NaCl 10 mM fría y se -- resuspende en 5 ml de CaCl_2 30 mM frío. Se incuba en hielo por 20 min.
- c) Inmediatamente, 0.2 ml de esta suspensión de células se adicio- na a un tubo que contiene 2 mg de DNA puro circular cerrado en 30 mM de CaCl_2 en un volumen final de 0.1 ml.
- d) El tubo se mezcla suavemente e incuba por 60 min a 0°C.
- e) La mezcla se incuba a 42°C por 70 segundos (pulso térmico) e -- inmediatamente se translada a 0°C por 5 min.
- f) Se agregan 3 ml de caldo Luria y se incuban a 37°C con agitación por 3 horas.
- g) Las células transformantes se seleccionan en medio Luria sólido con Sm 200 µg/ml y Tc 5 µg/ml.

3. Verificación fenotípica y visualización de los plásmidos.

El fenotipo de las células construídas se verificó por parcha do y replicado en los medios convenientes para cada plásmido (Tabla II).

La presencia de los plásmidos y sus pesos moleculares se probó a través del método de lisado claro y microensayo de DNA de los plásmidos.

3.1 Método de lisado claro (según Romilio Espejo, comunicación personal).

- a) En 10 ml de caldo Luria se inocula 1 ml de la cepa precrecida -- toda la noche, se incuba con agitación a 37°C hasta la fase exponencial media (D.O.₅₅₀ nm a 0.7).
- b) El cultivo se centrifuga a 3,000 rpm por 10 min a 4°C. El precipitado se lava con 10 ml de amortiguador TE (trizma base -- 50 mM, EDTA 0.3 mM pH 8.) y se resuspende en 0.25 ml del mismo amortiguador.
- c) Se añade 0.5 ml de NaOH 1 M, se mezcla suavemente e incuba a -- 37°C por 10 min.
- d) Se añade 0.05 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% y se incuba a 37°C por 10 min.
- e) A continuación, se adiciona 0.06 ml de la solución neutralizadora (Tris-HCl 2.4 M, trizma base 0.2 M) y se mezcla suavemente.
- f) Se incuba de 3-5 horas a 50°C y a -20°C de 12 a 16 horas.
- g) La fracción viscosa se elimina por decantación. A la fracción acuosa se le agrega azul de bromofenol 0.1% y glicerol 10%.
- h) La muestra se analiza posteriormente por electroforesis.

3.2 Microensayo del DNA de plásmido

Se utilizó el método modificado de extracción alcalina del -- DNA de plásmido reportado por Birboin y Daly (83).

Soluciones utilizadas:

- I 2 mg/ml de lisozima en 50 mM de glucosa, 10 mM EDTA y 25 mM --
Tris-HCl pH 8.0.
- II 0.2 N NaOH y 1% de SDS
- III 3M de acetato de sodio pH 4.8 (El pH se ajusta con ácido acético
glacial).
- IV 0.1 M acetato de sodio en 0.05 M Tris-HCl pH 8
- V 1 mg de RNasa en 1 ml de solución 5 mM Tris-HCl pH 8 (esta solución
se incuba a 80°C para inactivar DNAsas contaminantes).

Procedimiento:

- a) Se centrifuga 3 ml de cultivo precrecido durante 18 horas en una microfuga Eppendorff por 10 min. Las células se lavan con 10 mM de NaCl y se resuspenden en 150 µl de la solución I, in cubándose en hielo por 30 min.
- b) A las células se les agrega 400 µl de la solución II mezclando suavemente.
- c) Se incuba 5 min en hielo y se agrega 350 µl de la solución --
III, mezclando por inversión.
- d) El tubo se incuba 5 min a -40°C (hielo seco). Durante este -
tiempo se precipita el DNA cromosomal, proteínas y RNA de alto peso molecular.
- e) Se centrifuga por 10 min, al sobrenadante se le agrega eta--
nol hasta la parte superior del tubo con el fin de precipitar el DNA del plásmido. Se incuba a -40°durante 30 min.

- f) El precipitado se colecta por centrifugación y disuelve en - 150 μ l de la solución IV. Se precipita con 450 μ l de etanol a -20°C .
- g) Se repite el paso anterior.
- h) Se centrifuga por 10 min. y el precipitado se seca para eliminar el etanol.
- i) Se resuspende en 36 μ l de agua más 2 μ l de la solución V. Se incuba a 37°C por 20 min.

El DNA obtenido puede utilizarse para digestiones con enzimas de restricción o bien directamente para electroforesis.

4. Determinación de los niveles de resistencia a Tetraciclina.

La determinación de los niveles de resistencia se llevó a cabo de la siguiente forma:

Se inoculó 5 ml de Luria y 5 ml de Luria con 1 $\mu\text{g/ml}$ de Tc con 0.5 ml de células en la fase exponencial, se incubó en matraces nefelométricos de 250 ml a 37°C con agitación lenta hasta una $\text{DO}_{550 \text{ nm}}$ de 0.2 (aproximadamente 1×10^8 células/ml).

Se sembró por espatulado 0.1 ml de la dilución 10^6 de los cultivos no inducidos e inducidos con Tc en Luria sólido y Luria sólido con 1 $\mu\text{g/ml}$ de Tc respectivamente. Las colonias resultantes se replicaron en cajas con 0, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de Tc.

La concentración a la cual existe aproximadamente el 50% de -- células sobrevivientes se tomó como el nivel de resistencia de la cepa.

5. Curvas de Crecimiento

Las curvas de crecimiento fueron hechas de la manera siguiente: se inocularon matraces nefelométricos con 10 ml de medio Luria o ML con 0.2 ml de células en fase estacionario e incubaron a 37°C con agitación midiendo la DO_{550} nm a diferentes tiempos.

6. Ensayo de Transposición

El método utilizado fué el descrito por N. Kleckner (80) con algunas modificaciones:

- a) Para cada ensayo se inoculan por separado 3 colonias aisladas de la cepa donadora NK5830/Flac pNK81 en medio Luria y se crecen con agitación a 37°C a una DO_{550} nm de 0.2.
- b) Se mezcla 1 ml de estos cultivos con 2.5 ml de un cultivo de la cepa receptora NK6641 (Tabla II) precrecida a una D.O.₅₅₀ nm de 0.35. La mezcla se incuba a 37°C sin agitación por 60 min.
- c) Se agita vigorosamente y las exconjugantes (NK6641/Flac) se seleccionan sembrando por vaciado 0.2 ml de una dilución 10^{-5} del cultivo en medio mínimo (M L) con Sm.
- d) Las células en las cuales se efectúa la transposición (NK6641/Flac:: Tn10), se seleccionan sembrando por vaciado 0.5 ml del cultivo sin diluir, en medio mínimo con Sm 200 µg/ml.
- e) La frecuencia de transposición se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Frecuencia de Transposición} = \frac{\text{Núm. de exconjugantes/ml donde existió transp.}}{\text{Núm. de exconjugantes/ml totales}}$$

7. Purificación de minicélulas

Siguiendo básicamente el método de Curtiss (49).

- a) Las cepas con pSC101, pRSD1, RP4 y N-3 se estrían en medio Luria sólido adicionado con Tc 5 µg/ml y las cepas con R100 y pBRs22 con Luria con Tc 25 µg/ml.
- b) Se suspende una asada de la cepa productora de minicélulas con el plásmido deseado en 3 ml de medio mínimo (ML) y se ajusta a una DQ_{550} nm de 0.1.
- c) Se inocula un litro de medio de cultivo ML con 1 ml de dicha suspensión bacteriana y se incuba a 37°C con agitación continua a 200 rpm durante 17 horas.
- d) Las células se colectan a través de 2 centrifugaciones diferenciales: la primera, a 2,500 rpm por 5 minutos a 4°C, paso para enriquecer minicélulas en el cual se descarta la pastilla; la segunda a 8,500 rpm por 15 min en la cual se descarta el sobrenadante.
- e) La pastilla se resuspende en 2 ml de amortiguador BSG (NaCl 85%, KH_2PO_4 0.03%, Na_2HPO_4 y 0.06% y gelatina 0.01%) por cada 250 ml de cultivo.
- f) Se prepara un gradiente continuo de sacarosa colocando 1.5 ml de la suspensión por gradiente. Los gradientes se preparan conge-

lando y descongelando lentamente la sacarosa al 20% en NaCl --
0.1 M, Tris- HCl 0.001 M, EDTA 5 mM.

- g) Los gradientes se centrifugan a 5,000 rpm por 15 min a 4°C, se se diluye con BSG.
- h) Se centrifuga a 15,000 rpm por 15 min y la pastilla se resuspende en 2 ml de BSG.
- i) Se repite el gradiente y el lavado anterior.
- j) La pastilla de minicélulas se resuspende en ML adicionado de --
MgSO₄ y glucosa (sin aminoácidos). Se ajusta la concentración de minicélulas a 0.2 unidades de densidad óptica (número de minicélulas aproximadamente de 7-8 x 10⁸ por ml).
- k) Se efectúa una cuenta viable de la suspensión, espatulando sobre medio Luria sólido 0.1 ml del cultivo (contaminación aceptable 1 célula/10⁵ minicélulas).

8. Marcaje de proteínas

- a) A 1 ml de minicélulas se le añade todos los aminoácidos esenciales a excepción de metionina, a una concentración de 50 µg/ml.
- b) En los tubos donde se induce la resistencia a Tc, se adiciona este antibiótico a una concentración final de 1 µg/ml.
- c) Las minicélulas se incuban por 15 min (tiempo necesario para inducir la síntesis de proteína involucradas en la resistencia) - a 37°C con agitación lenta.

- d) En los tubos en que se inhibe la girasa se añade Novo a una concentración de 50 µg/ml.
- e) A todos los tubos se les añade ^{35}S Metionina a una concentración de 50 µCi/ml y se incuban a 37°C por 30 min.
- f) Las minicélulas se centrifugan por 10 min a 10,000 rpm y se decantan rápidamente.
- g) La pastilla se resuspende en 50 µl de la mezcla de solubiliza--ción (glicerol 5%, SDS 4%, Tris-HCl, mercapto etanol 10% y azul de bromofenol 0.025%).

Las muestras pueden ser almacenadas a -70°C para su electroforesis posterior.

9. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida

Se utilizó el método de la Laemmli (84) con algunas modifica--ciones:

La electroforesis se llevó a cabo en placas de 0.15 cm de grosor, las dimensiones del gel fueron de 18 X 10 cm para el gel separador y 18 x 1 cm. para el concentrador. La concentración de acrilamida bisacri--lamida utilizadas para el gel concentrador fueron de 7.5 - 5% y de 12 - 0.5% para el separador. El pH del gel concentrador fué de 6.8 y el separador de 8.8.

- a) El gel se corre en presencia de SDS 10% y como catalizadores se utilizan persulfato de amonio 10% y TEMED.

- b) Se aplican 20 μ l de la muestra de minicélulas, previamente incubadas a 50°C por 4 min por carril.
- c) El gel se corre con una corriente de 10 mA para el gel concentrador y de 20 mA para el separador.

El amortiguador usado fué Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 1% pH 8.4. Las bandas son teñidas con azul de Coomasie 0.06%, metanol - 30%, ácido acético 10% por 45 min a 50°C y el exceso de colorante se removió con una solución de ácido acético 10% por 10 horas a 42°C.

10. Secado y Autorradiografía

- a) Una vez teñido el gel se incuba 1 hr en 20 volúmenes de Dimetil-Sulfóxido (DMSO) para deshidratarlo.
- b) Se transfiere a una solución de PPO (2,5-diphenyloxazole) 22.2% en DMSO y se incuba por tres horas.
- c) Posteriormente, el gel se transfiere a agua destilada por 2 hr, tiempo en el cual el PPO se precipita.
- d) El gel montado sobre una hoja de papel Whatman 3 mm y cubierto con celofán dulce, se seca con calor y vacío por dos horas en un secador de Geles Bio-Rad.
- e) Una vez seco el gel se expone a una placa radiográfica (Kodak - XS-5) durante 72 horas a -70°C.
- f) Para revelar la película se utiliza el procedimiento recomendado por Kodak.

11. Electroforesis de DNA en Geles de Agarosa

La electroforesis se llevó a cabo en placas de 13 x 10 x 0.15 cm (85).

- a) Agarosa en polvo (Bio-Rad) al 0.8% se disuelve por ebullición durante 1-2 min, en una solución de Tris-acetatos-EDTA (trisma-base 50 mM, EDTA 20 mM, acetato de sodio 20 mM, NaCl 18 mM pH 8).
- b) Se vacían los geles y se dejan solidificar.
- c) Las muestras se colocan en un volumen final de 20-50 μ l por -- carril (0.3 - μ g de DNA por carril disuelto en solución SM (SM: para 10 ml: 6 gr de urea, 1 ml de 0.5% azul de bromofenol en -- agua).
- d) La electroforesis se lleva a cabo a voltaje constante, de 100 - 150 V a 4°C por dos horas aproximadamente utilizando amortiguador Tris acetatos- EDTA.
- e) Después de terminada la electroforesis, los geles se sumergen - en una solución de bromuro de etidio (4 mg/ml) y al someterlo a la luz ultravioleta se observan las bandas.

Para fotografiar los geles se utiliza un filtrado de gelatina amarilla N° 9 Kodak-Wratten y película Polaroid NP tipo SS con una cámara MP 5 Polaroid.

12. Método de hibridización DNA-DNA

Se siguió básicamente el método de Southern (86) con algunas modificaciones:

12.1 Gel de agarosa

- a) Las muestras obtenidas por lisado claro (R100, RP4, PRSD1, N-3) o por microensayo de DNA (pBR322, pSC101) se corren en un gel de agarosa 1% a 100 V por 3 hr, el gel se tiñe y fotografía.
- b) El gel se trata durante 30 min con una solución de 1.0 M de NaCl 0.5 M de NaOH (tiempo en el cual se desnaturaliza el DNA) y se transfiere a la solución neutralizadora (Tris 1 M, NaCl 3 M pH 7.5) por 20 min.
- c) Con el gel montado sobre un vidrio plano y en contacto con un filtro Swand-Shults se lleva a cabo la transferencia en presencia de amortiguador SSC 6X (0.15 M NaCl, 15 mM citrato de Na) durante 4 horas.
- d) El filtro después de la transferencia se seca en un horno de vacío a 80°C por 4 horas para fijar el DNA.

12.2 Hibridización

La hibridización de los filtros se llevó a cabo siguiendo básicamente el método de Southern, las soluciones utilizadas son:

1) Amortiguador de hibridización:	Formamida	50%
(Denhart's)	SSC	3X
	EDTA	0.1 M
	SDS	10%
	Tris-HCl	1 M pH 7.5
	Ficoll	0.02%
	BSA (albúmina bovina)	0.02%
	Polivinilpirrolidona	0.02%

El amortiguador de prehibridización es igual al de hibridización adicionado con 50 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonificado.

2) Amortiguador SSC 1X:	NaCl	150 mM
	Citrato de sodio	15 mM

la metodología es la siguiente:

- a) Los filtros son prehibridizados en una bolsa de plástico en presencia de 10 ml de amortiguador de prehibridización con agitación lenta por 12 hr a 37°C.
- b) Se saca el amortiguador de prehibridización y se colocan 10 ml - del amortiguador de hibridización al cual se le agrega el fragmento de DNA marcado radioactivamente y desnaturalizado por calentamiento (aproximadamente $2-4 \times 10^6$ cpm). El filtro se incubaba con agitación lenta durante 48 hr a 37°C.
- c) El filtro se lava tres veces por espacio de 15 min en un volumen de 500 ml de la siguiente manera:

primero: con 2X SSC, 0.1% SDS;

segundo: con 0.1X SSC, 0.1% SDS;

tercero: con 0.1X SSC

- d) Se seca el filtro con papel Whattman 3 mm a 37°C y se expone a autorradiografía durante 36 horas.

12.3 Marcaje enzimático de DNA

Basado esencialmente en el método reportado por New England Nuclear Lab.

Se colocan los siguientes componentes para la reacción en el orden enunciado:

- | | |
|---|-----------------|
| 1) Desoxicitosina trifosfato dCTP (^{32}P) | 5 μl |
| 2) Amortiguador de marcaje | 5 μl |
| 3) Agua destilada | 5 μl |
| 4) DNA polimerasa I | 2 μl |
| 5) 0.5 g del fragmento puro de DNA | 2 μl |
| 6) DNasa I | 2 μl |

La reacción se incuba durante 180 min de 12-14°C

- b) La reacción se pasa agregando 25 μl de amortiguador T (0.02 M de N_3EDTA , 2 mg/ml del DNA acarreador sonificado, 0.2% SDS).
- c) Se mezcla, se pasa por una columna de Sephadex G 50 utilizando amortiguador A-50 (NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, SDS -- 0.01%, NaN_3 1 mM) y se recolecta alícuotas de 1 ml. en tubos Eppendorff.
- d) Los tubos que contengan radioactividad se precipitan con dos volúmenes y medio de etanol puro y un décimo del volumen de -- acetato de sodio 3M durante 18 hr a -20°C.
- e) Los tubos son centrifugados 10 min y el sobrenadante se decanta rápidamente. El precipitado se lava con 1 ml de etanol 70% y se seca.
- f) El DNA se resuspende en agua destilada y es usado para la hibridación.

VI. RESULTADOS

1. Caracterización de las Cepas

A las cepas construídas por transformación o conjugación, como se describió en Materiales y Métodos, les fué verificado su fenotipo por replicación en los medios convenientes para cada caso según el plásmido que contenían (Tabla I).

Posteriormente, con el objeto de comprobar la presencia de -- los plásmidos, se extrajo el DNA de las cepas por el método de lisado claro para los plásmidos R100, pRSD1, RP4 y N-3 y por el método de microensayo de DNA para los plásmidos pSC101 y PBR322. Los lisados se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Como puede verse (Figura 9), todos los plásmidos utilizados en el trabajo, a excepción del plásmido pSC101 y pBR322, migran arriba de la banda cromosomal que tiene un peso aproximado de 10-12 Md (87). En este caso, cada uno de los plásmidos fué control de si mismo ya que sus pesos moleculares han sido reportados anteriormente. Los plásmidos de peso molecular más bajo utilizados en -- este trabajo son el pSC101 con un peso aproximado de 5.4-5.6 Md y el -- pBR322 con 2.83 Md. Los pesos moleculares de todos los plásmidos pueden -- verse en la Tabla IV.

2. Niveles de Resistencia a la Tetraciclina

En las cepas con diferentes plásmidos se cuantificó el nivel de resistencia, inducido y no inducido, a la Tc. Se tomó como el nivel de resistencia de la cepa, la concentración de Tc en la que sobrevivió el

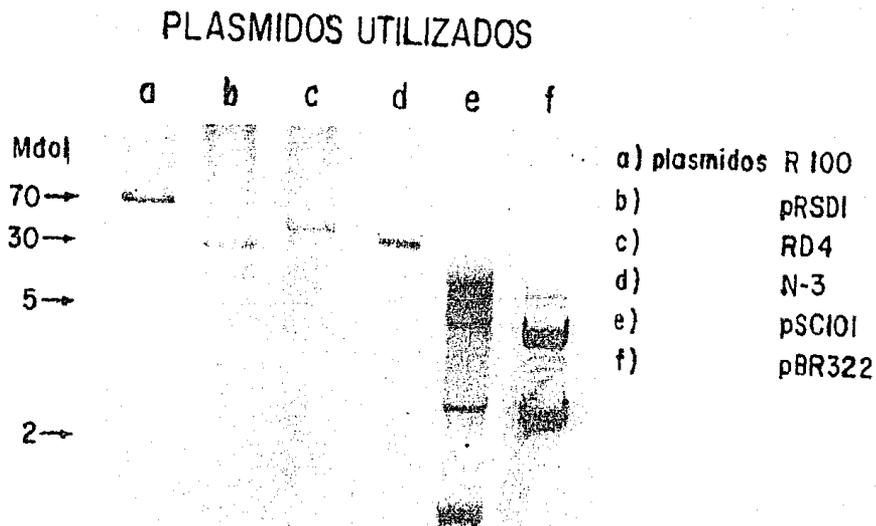


Figura 9. Electroforesis en agarosa 0.8%, corrida a voltaje constante 1.1 V/cm³. Carril 1: pSCI01; carril 2: plásmido R100; carril 3: plásmido pRSDI; carril 4: plásmido RP4; carril 5: plásmido N-3; carril 6: plásmido -- pBR322. En los carriles 1 y 6, pueden observarse varias bandas que corresponden a diferentes formas moleculares de los plásmidos.

TABLA IV

PESOS MOLECULARES DE LOS PLASMIDOS

Plásmido	Peso molecular en Kd	Referencia
1) pBR322	2.8	85
2) pSC101	5.4	62
3) pRSD-1	30.0	79
4) N-3	33.0	—
5) RP-4	40.0	77
6) R-100	70.0	76

50% de las células sembradas. Los niveles de resistencia encontrados para los plásmidos pSC101, RP4, R100 y N-3 concuerdan con lo reportado por Méndez et al. (29). Tabla V.

TABLA V

NIVEL DE RESISTENCIA A LA TETRACICLINA
DE LOS DIFERENTES PLASMIDOS

Plásmido	Niveles de resistencia	
	No inducido	Inducido
1) pSC101	25 µg/ml	25-50 µg/ml
2) R100	100 µg/ml	150 µg/ml
3) RP4	50 µg/ml	75 µg/ml
4) pRSD1	25 µg/ml	70 µg/ml
5) N-3	75 µg/ml	10 µg/ml
6) pBR322	75 µg/ml	---

Todos los plásmidos utilizados en el trabajo, a excepción del pBS322, presentaron una resistencia inducible tras un contacto previo con el antibiótico; esta inducción provoca una mayor resistencia a la Tc.

El menor nivel de resistencia a la Tc lo representó la cepa con el plásmido pSC101, la cual inducida presenta un nivel de resistencia de 25 µg/ml. La cepa con el plásmido pBR322 que contiene parte de la información genética para la resistencia a la Tc presente en el pSC101, mostró un nivel de resistencia más elevado (75 µg/ml); sin embargo, en este caso la resistencia no es inducible. El mayor nivel de resistencia lo presentó la cepa con el plásmido R100 (150 µg/ml).

3. Homología de las Secuencias de DNA de los Diferentes Plásmidos.

Para tener plena seguridad de que los plásmidos escogidos pertenecen a diferentes clases de resistencia (Tabla I) y que no hibridan entre sí como ha sido reportado por Méndez et al. (29), se hizo una hibridación DNA-DNA (Southern) (86).

En este caso, se utilizó como monitor un fragmento de 700 pb comprendido entre los sitios de las enzimas de restricción Hind III y SalI del plásmido pBR322 (Apéndice 1). En este fragmento se localiza parte --del gen Tet de resistencia a Tc. Originalmente este gen se localizaba en el plásmido pSC101.

El fragmento de DNA se obtuvo a partir del DNA puro del plásmido pBR322 digerido con las enzimas mencionadas y electrocluído de un gel de agarosa 1.2%. Posteriormente el DNA fué marcado con α (³²P) CTP por el

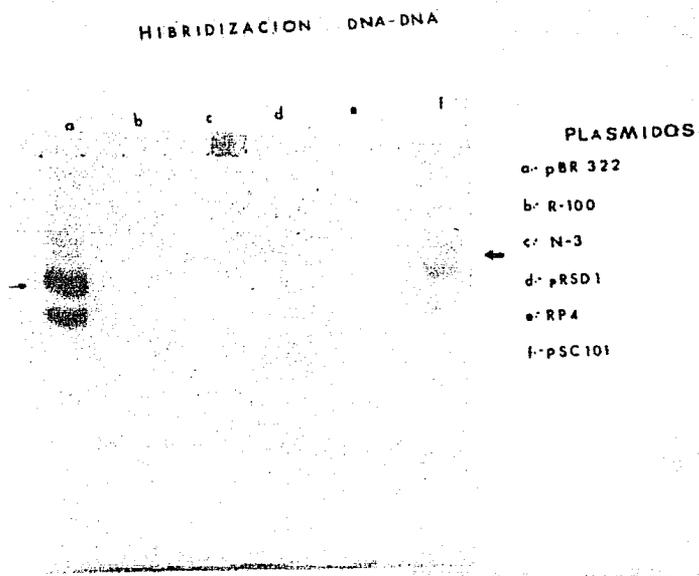


Figura 10. Hibridización DNA-DNA (Southern) de los diferentes plásmidos utilizados en el trabajo con el fragmento de HindIII- Sali (700 pb) del gen Tet del plásmido pBR322.

método de marcaje enzimático de DNA (Materiales y Métodos). El DNA de -- los diferentes plásmidos fué transferido a un filtro de nitrocelulosa e hibridado contra el fragmento marcado que sirvió de rastreador.

En la Figura 10 puede apreciarse esta hibridización con todos los plásmidos utilizados en el trabajo. Ninguno de ellos, a excepción de los plásmidos pBR322 y pSC101 (controles positivos), hibridizan con el -- fragmento utilizado, con ello comprobamos que las diferencias fenotípicas entre cada una de las clases propuestas (Tabla I) responden a disimilitudes genéticas, las cuales nos hablan de un posible origen diferente para cada uno de estos determinantes.

4. Curvas de Crecimiento y Tiempo de Generación de la Cepa P678-54 con los Diferentes Plásmidos.

Las bacterias se dividen por fisión binaria y por lo tanto la cinética de crecimiento es exponencial hasta alcanzar la fase estaciona-- ria del cultivo. La rapidez de esta cinética está determinada, entre -- otros factores, por la disponibilidad de los nutrientes en el medio de -- cultivo. Se ha reportado que la presencia de algunos plásmidos en una -- cepa bacteriana puede modificar el tiempo de generación de la misma aumen-- tándolo o disminuyéndolo (88). Ya que se pretendía hacer estudios compa-- rativos de los diferentes plásmidos a través del uso de minicélulas, se -- hicieron curvas de crecimiento de estas cepas con cada uno de los plásmi-- dos con el fin de comprobar si alguno o algunos de éstos tenía algún efec-- to sobre el tiempo de generación del cultivo.

En la Figura 11 están graficadas las curvas de crecimiento de la cepa P678-54 con y sin plásmidos crecidas en medio mínimo (ML). Utilizando la pendiente de la curva en la fase exponencial, se determinó el tiempo de generación para cada una de las curvas anteriores (Tabla VI).

TABLA VI
TIEMPO DE GENERACION

Cepa	- Plásmido	Tiempo de generación
P67854	--	36 min
P678-54	pSC101	42 min.
P678-54	RP4	38 min
P678-54	R100	39 min
P678054	N-3	45 min
P678-54	PRSD1	36 min
P678-54	pBR322	32 min

Como puede observarse, ninguno de los plásmidos utilizados modificó de manera drástica el tiempo de generación de la cepa. En base a estos resultados se esperó que utilizando un mismo inóculo y tiempo de incubación, todos los cultivos alcanzarían en una fase similar de crecimiento.

Existe una pequeña diferencia en cuanto al tiempo de generación para la cepa conteniendo los plásmidos pSC101 y N-3 en comparación con la cepa sin plásmido, la cual no puede explicarse por el tamaño de

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA P678-54

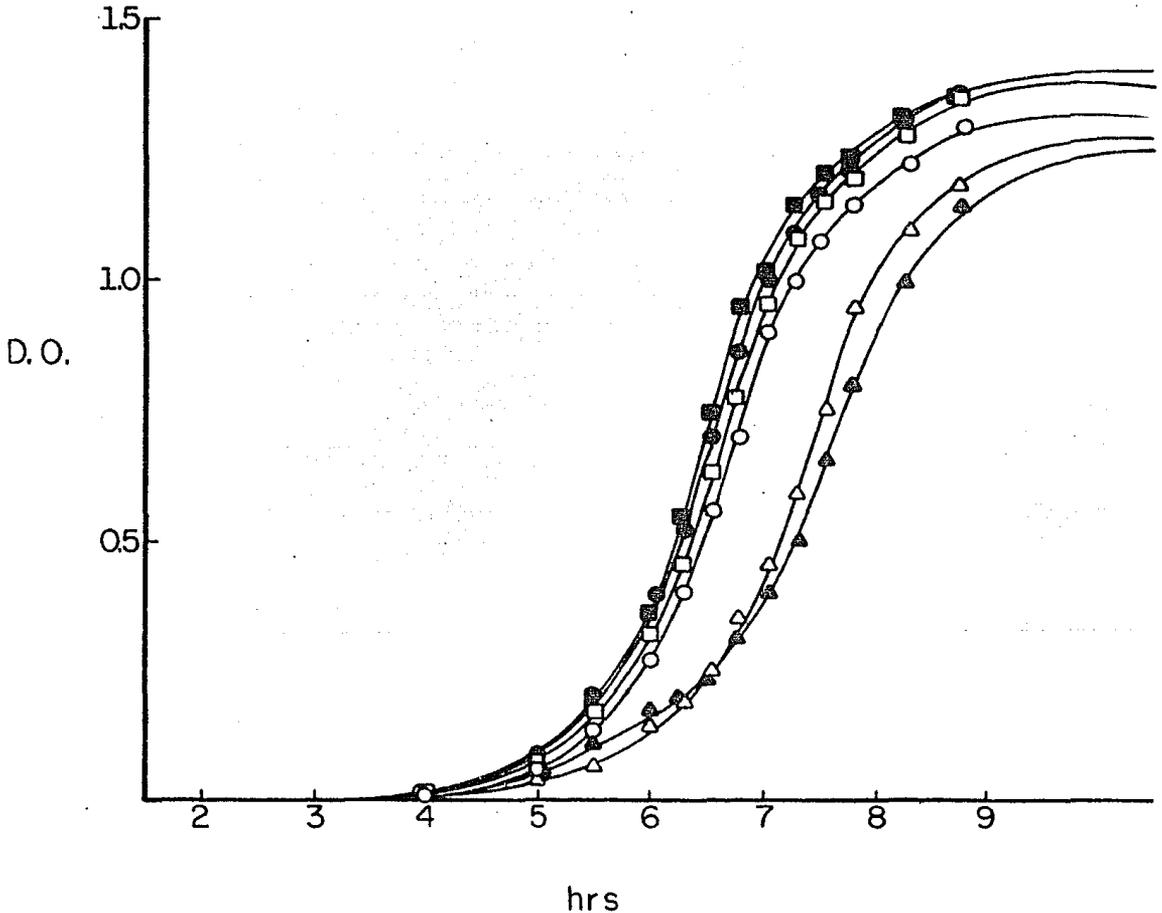


Figura 11. Las curvas se hicieron en medio mínimo (ML) o curva 1: cepa P678-54 sin plásmido; Δ curva 2: P678-54/pSC101; \blacksquare curva -- 3: P678-54/RP4; \blacktriangle curva 4: P678-54/R100; \square curva 5: P678-54/N-3; \bullet curva 6: P678-45/pRSD1. El inóculo usado para todas las curvas fué el mismo: 10^8 cel/ml. El cultivo se incubó con agitación a 37°C con agitación lenta.

los plásmidos como ha sido propuesto por algunos autores (88) ya que existe una diferencia notoria entre ellos; el N-3 es un plásmido grande -- (33 Md) mientras que el plásmido pSC101 es relativamente pequeño (5 Md). Por lo tanto nosotros nos inclinamos a pensar que este efecto se debe a otra u otras características de estos plásmidos.

5. Inducción de la Resistencia a Tetraciclina in vivo con los diferentes Plásmidos.

Uno de los propósitos del trabajo era inducir la resistencia a Tc de las cepas que contenían los diferentes plásmidos y observar esta inducción en el sistema de minicélulas. Las minicélulas fueron purificadas en la etapa estacionaria del cultivo bacteriano, por lo que era necesario comprobar si el fenómeno de inducción de la resistencia al antibiótico podría efectuarse sin importar el estado de crecimiento en el que se encontrara el cultivo.

El crecimiento de un cultivo bacteriano se ha dividido en cuatro etapas diferentes:

- a) Fase lag
- b) Fase exponencial o logarítmica
- c) Fase estacionaria
- d) Fase de muerte exponencial

Experimentalmente, se decidió tomar al plásmido pSC101 como prototipo para este experimento. La cepa con el plásmido fué inducida -- con Tc 5 µg/ml en tres diferentes etapas de crecimiento.

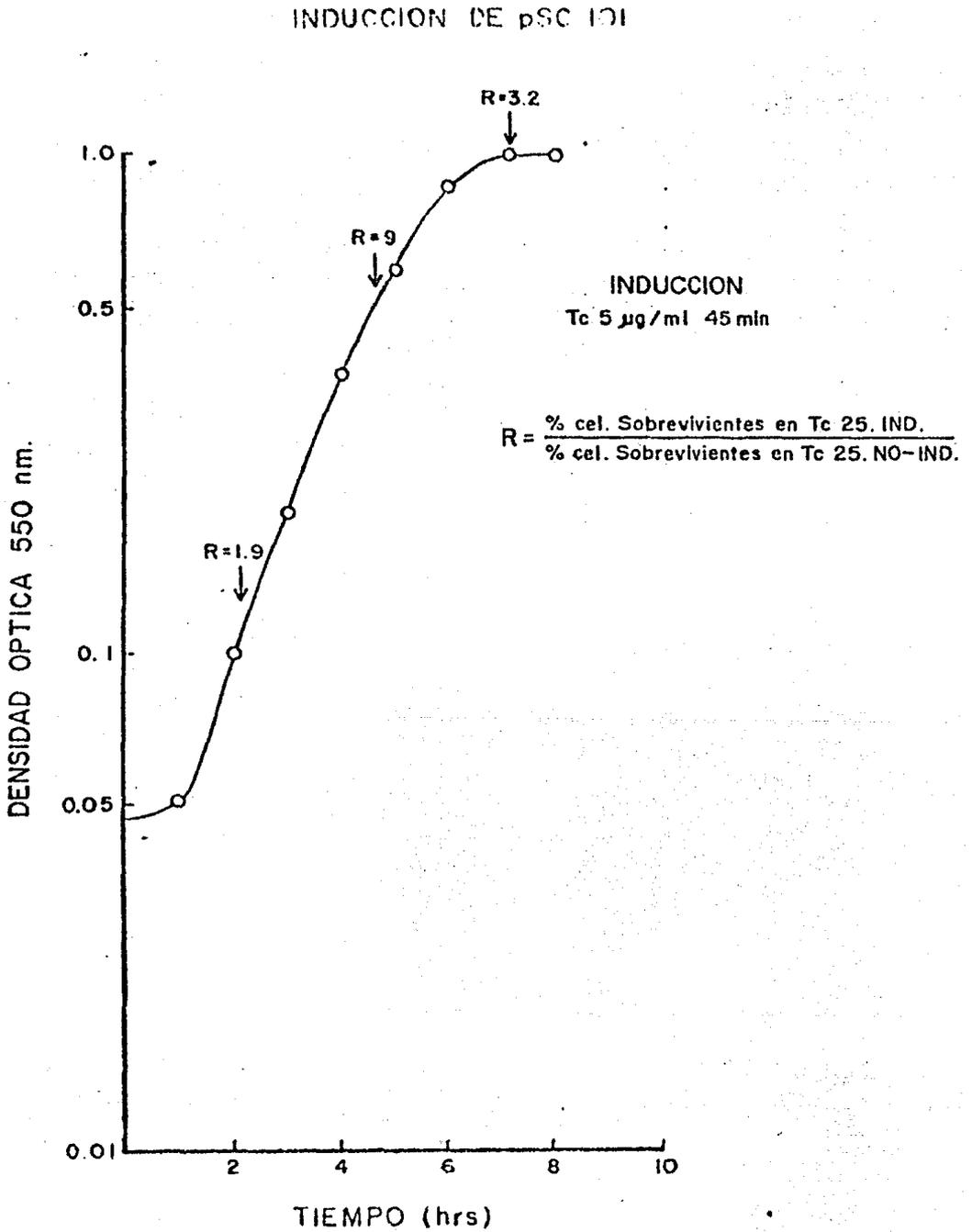
Fase de Inducción	DO ₅₅₀ a la que se indujo
1. Fase exponencial temprana	0.12
2. Fase exponencial tardía	0.50
3. Fase estacionaria	1.35

Una vez añadida la Tc, la cepa se incubó por 45 min a 37°C, tiempo necesario para la inducción (29), se diluyó y sembró sobre Luria o Luria Tc 5 µg/ml (cepa no inducida a inducida respectivamente) y todas en Luria Tc 25 µg/ml. El número de colonias obtenidas en Luria y Luria Tc 5 µg/ml se tomó como el 100% de crecimiento.

El factor de inducción R para cada etapa de crecimiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{\% \text{ de células sobrevivientes en Tc } 25 \text{ } \mu\text{g/ml cepa INDUCIDA}}{\% \text{ de células sobrevivientes en Tc } 25 \text{ } \mu\text{g/ml cepa NO INDUCIDA}}$$

Figura 12.



Como se puede ver, el factor de inducción R para cada una de las etapas fué diferente. Para la fase exponencial media, este factor - fué de 9 veces con respecto a la cepa no inducida siendo el mayor factor encontrado. Esto demuestra que existe una etapa de crecimiento óptima - para la inducción de la resistencia a la Tc y que es la fase exponencial.

A pesar de que en la etapa en la que son purificadas las minicélulas no presenta un factor de inducción tan grande como en la fase - exponencial, el factor obtenido fué de 3.2 el cual es suficiente para los estudios que se pretenden llevar a cabo en las minicélulas.

El hecho de que exista una etapa preferencial para la inducción de la resistencia a la Tc, creemos pueda estar relacionado con el estado de la célula, presencia o ausencia de algún metabolito en las diferentes etapas que se investigaron. Un aspecto que nos parecería interesante de investigar es alguna relación con los niveles de AMP en estudios posteriores.

6. Inducción de la Resistencia a Tetraciclina in vitro

Para observar los polipéptidos involucrados en el fenómeno de resistencia a Tc de los diferentes plásmidos, se utilizó el sistema de minicélulas.

Se ha reportado que muchos de los fenómenos observados in vivo no pueden extrapolarse fácilmente a las minicélulas (49), por lo que se -- procedió a montar las condiciones óptimas para la visualización de las diferentes proteínas codificadas por los plásmidos estudiados.

a) Inóculo. El aumento en el número de bacterias es proporcional al número de bacterias presentes originalmente en el medio de cultivo, de tal manera que al aumentar la cantidad de inóculo (número de bacterias al tiempo cero) el cultivo alcanza una mayor rapidez la fase estacionaria. Con el propósito de comprobar si el estado fisiológico del cultivo influía de alguna forma en la visualización de las proteínas asociadas a la resistencia a Tc fueron agregados tres diferentes inóculos de la cepa P67854 conteniendo el plásmido pBR322.

Los inóculos usados fueron:

Inóculo	
1) 0.1 ml	1×10^4 células/ml
2) 1 ml	1×10^5 células/ml
3) 10 ml	1×10^6 células/ml

Las minicélulas de estos inóculos fueron purificadas, marcadas y sometidas a electroforesis (Fig. 13).

La autorradiografía muestra que el cultivo en fase estacionaria más temprana (menos inóculo), contiene proteínas RNA'sm de vida media larga, provenientes de la célula progenitora, lo cual ha sido reportado con anterioridad (89). El peso molecular de una de estas proteínas es muy cercano al peso molecular de una de las proteínas involucradas en la resistencia a Tc (proteína de 36 Kd) pudiendo interferir en su visualización.

INFLUENCIA DE LA EDAD DEL CULTIVO EN LA EXPRESION GENETICA DE pBR322

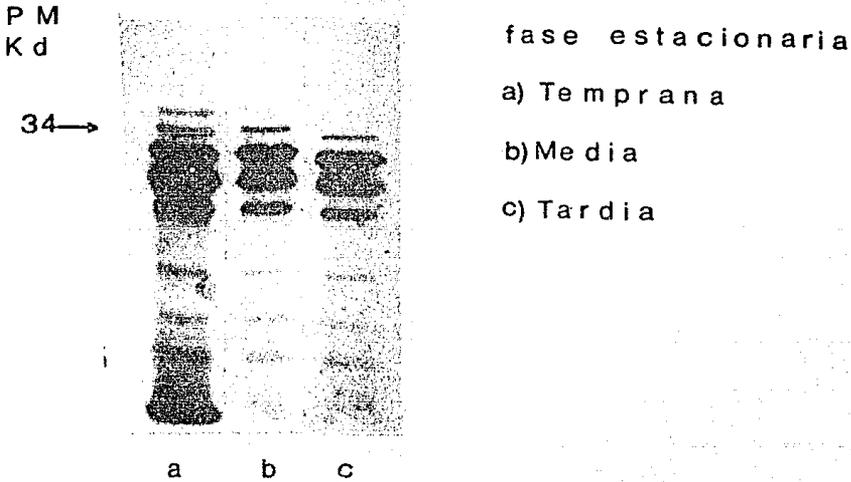


Figura 13. Influencia de la edad del cultivo en la expresión genética de pBR322. Las minicélulas con el plásmido pBR322 se cosecharon en diferentes estados de crecimiento. Se incubaron con $[^{35}\text{S}]$ metionina y las proteínas se separaron en geles de acrilamida como se describe en Materiales y Métodos. La flecha a la izquierda de la figura la proteína TET (34 Kd).

Se observó que a medida que el cultivo se encontraba en una fase estacionaria mas tardía, como el caso del mayor inóculo, la incorporación de la marca radioactiva disminuye notoriamente, de tal manera que las proteínas presentes en baja concentración no pudieron visualizarse. Se eligió el inóculo intermedio (carril b) para llevar a cabo los estudios siguientes ya que en éste no existe la presencia de las proteínas provenientes de mensajeros cromosomales y existe una buena incorporación de la marca radioactiva.

- b) Sensibilidad de minicélulas a tetraciclina. Otro parámetro analizado fué la concentración óptima del antibiótico para la inducción de la resistencia. Ya que los estudios in vivo llevados a cabo a este respecto no podían ser extrapolados al sistema de minicélulas y un uso inapropiado del antibiótico provocaría una baja total de la síntesis de proteínas.

Inicialmente se utilizó una concentración de Tc de 5 µg/ml, concentración que había sido usada en estudios con el plásmido -- pSC101 (48); sin embargo, se observó que esta concentración no era extrapolable para las cepas con los diferentes plásmidos, por lo que se procedió a conocer la concentración óptima para cada plásmido. La Figura 14 muestra un ejemplo para el caso de la cepa -- con el plásmido pRSD1.

El patrón que se observa en esta Figura fué el mismo para el caso de las cepas con los plásmidos R100, RP4, y N-3, no así para el plásmido pSC101, el cual muestra una mayor resistencia al antibió

SENSIBILIDAD A TC EN MINICELULAS

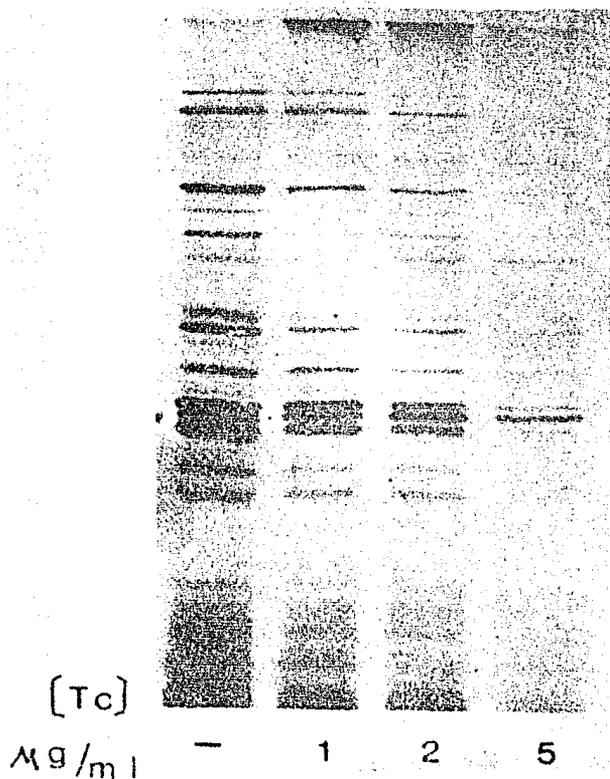


Figura 14. Sensibilidad de la Síntesis de Proteínas a Tc en las minicélulas con el plásmido pRSD1, tratadas con diferentes concentraciones de tetraciclina, todas ellas subletales para la célula. Carril 1: plásmido sin Tc; carril 2: 1 µg/ml de Tc; carril 3: 2 µg/ml de Tc; carril 4: 5 µg/ml de Tc.

tico en minicélulas que los otros plásmidos. La concentración se tomó para inducir la resistencia en todos los casos fué de 1 µg - de Tc por ml, la cual es suficiente en todos los casos para la -- inducción y no provoca una baja importante en la síntesis de proteínas en ninguna de las cepas con los diferentes plásmidos.

c) Proteínas inducidas en presencia de tetraciclina

Habiendo establecido los parámetros de inóculo y concentración - de Tc, se procedió a llevar a cabo la inducción de las proteínas involucradas en la resistencia a este antibiótico, de las cepas - conteniendo los diferentes plásmidos que se pretendían analizar, el procedimiento utilizado fué el descrito en Materiales y Méto-- dos. Las proteínas relacionadas con la resistencia se detectaron comparando el patrón de proteínas del mismo plásmido sin inducir. Para el caso de las cepas con los plásmidos RP4 y N-3, no fué posible obtener un patrón de inducción ya que estos plásmidos segregan poco a minicélulas, lo cual ha sido reportado ya para otros - plásmidos (49). El poco plásmido segregado no es suficiente para obtener un patrón definido de proteínas por lo que si se quieren llevar a cabo estudios de este plásmido, será necesario contar -- con un sistema diferente al utilizado en este trabajo.

En la Figura 15 pueden observarse las autoradiografías de minicélulas con los plásmidos R100, pSC101 y pRSD1.

Para el caso del plásmido R100 (carriles 1,2), se observa la in-- ducción de dos proteínas de 36 Kd y 15 Kd, estos resultados con--

PROTEINAS INDUCIBLES CON TETRACICLINA

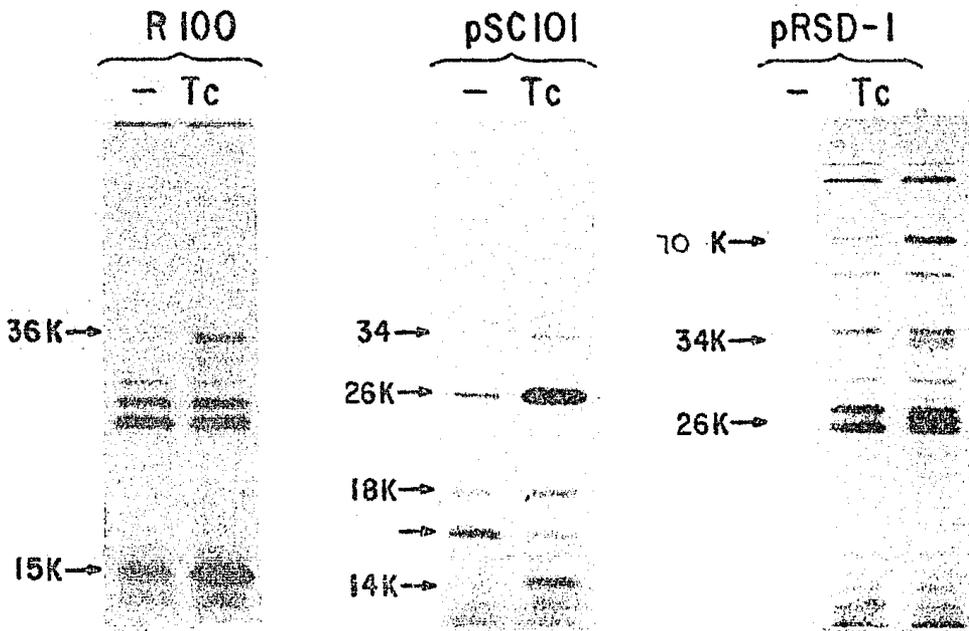


Figura 15. Proteínas inducidas con Tc en minicélulas con los plásmidos R100, pSC101 o pRSD1. Plásmido R100: carril 1, sin Tc; carril 2, R100 2 µg/ml de Tc. Plásmido pSC101: carril 1, sin Tc, carril 2, 5 µg/ml de Tc. Plásmido pRSD1: carril 1, sin Tc; carril 2, 2 µg/ml.

cuerdan con lo reportado por el grupo de Levy (29), quien reporta tres diferentes proteínas. La proteína de 25 Kd que se propone interviene en la resistencia, no se observa en nuestras condiciones ya que para detectarla es necesario efectuar una electroforesis bidimensional ya que comigra con otras proteínas codificadas por el del plásmido.

Para el plásmido PSC101 se detectó la inducción de cuatro proteínas de 36 Kg, 26 Kd, 18 Kd y 14 Kd (Figura 15, carriles 1 y 2). La proteína de 18 Kd, que había sido reportada como por proteína constitutiva, bajo nuestras condiciones es inducible por Tc. -- Para el plásmido PRSD1 (Figura 15, carriles 1,2) se observa la inducción clara de dos proteínas antes reportadas (90) de 34 Kd y 15 Kd. Además de estas proteínas se observó la inducción de una tercera proteína de alto peso molecular que pensamos pudiera intervenir en el fenómeno de resistencia. Con el propósito de tener una idea más clara en este aspecto se llevan estudios en este momento.

- d) Efecto de la temperatura sobre la visualización de las proteínas involucradas en la resistencia a tetraciclina.

Es importante hacer notar que la visualización de las proteínas inducidas con Tc, constituyó un problema, hecho que ha sido reportado por otros autores (76,). Se llevaron a cabo varios estudios sobre este aspecto y los resultados obtenidos indican que la proteína TET en especial, es sumamente sensible a varios factores: presencia de alguna(s) sustancias en el medio de culti-

vo, carencia de algún metabolito, etc. Uno de estos factores -- que nos pareció en especial interesantes y que fué analizado con mayor detalle es que la temperatura a la cual son solubilizadas las proteínas de minicélulas, tiene un efecto directo sobre la visualización de las proteínas TET.

Se probaron varias temperaturas de solubilización tomando como -- modelo la cepa de minicélulas con el plásmido R100. En este ex-- perimento todas las muestras se indujeron con Tc y se solubilizaron a diferentes temperaturas (Figura 16A).

Es patente el hecho de que a medida de que se aumenta la tempera-- tura a la cual se solubilizan las minicélulas antes de la electroforesis, la concentración de proteína TET disminuye notablemente. Se observó que 50% es la temperatura óptima para la visualización de esta proteína.

Otras proteínas involucradas en la resistencia no se ven afecta-- das de manera notable al variar la temperatura de solubilización lo cual indica que probablemente este efecto se deba a caracterís-- ticas de esta proteína. Este mismo resultado fué obtenido para -- los otros plásmidos pSC101 y pRSD1 (Figura 16).

7. Efecto de la DNA Girasa sobre la Expresión de las Proteínas de la Re-- sistencia a Tetraciclina

Una vez que se obtuvo el patrón de inducción para los plásmi-- dos R100, pSC101 y pRSD1, se procedió a investigar el efecto de la DNA gi-- rase sobre la expresión de los genes involucrados en la resistencia a Tc de estos plásmidos. De la misma forma que para la sección anterior, fue--

SOLUBILIZACION DE LA PROTEINA Tet DE R 100 A DIFERENTES TEMPERATURAS.

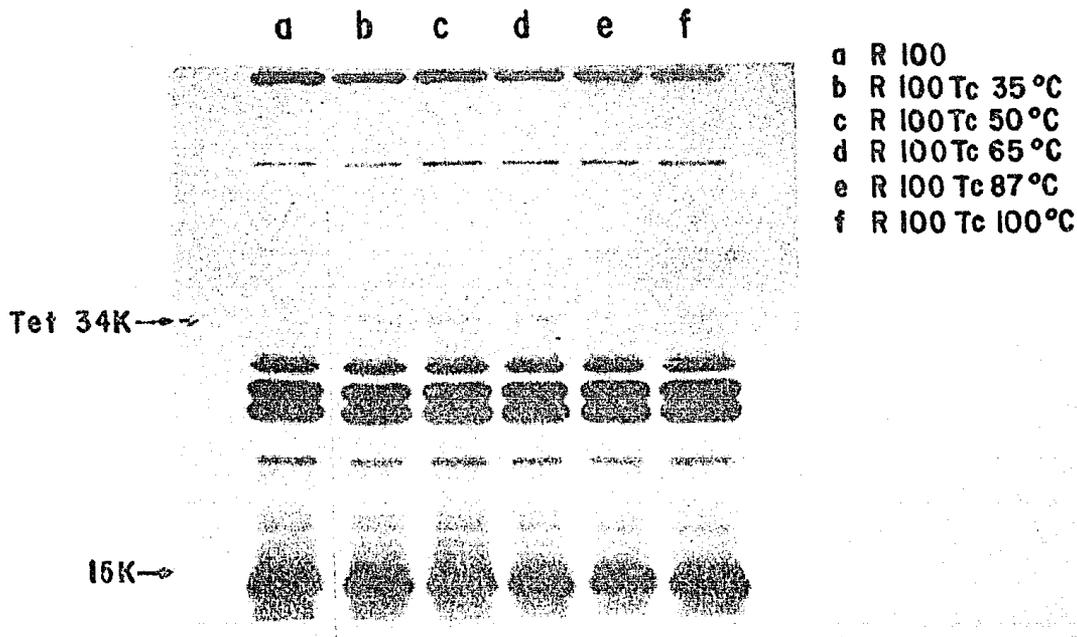


Figura 16A. Solubilización de las minicélulas con el plásmido R100 a diferentes temperaturas. Carril a: control, plásmido R100 sin Tc; carril b; plásmido R100 a -- 35°C; carril c: plásmido R100 a 50°C; carril d: plásmido R100 a 65°C; carril e: plásmido R100 87°C; -- carril f: plásmido R100 a 100°C del carril b al f con Tc 2 µg/ml. Las muestras se incubaron a la temperatura indicada durante 4 min. La cantidad de -- muestra aplicada es la misma en todos los carriles.

SOLUBILIZACION DE LA PROTEINA Tet A DIFERENTES TEMPERATURAS

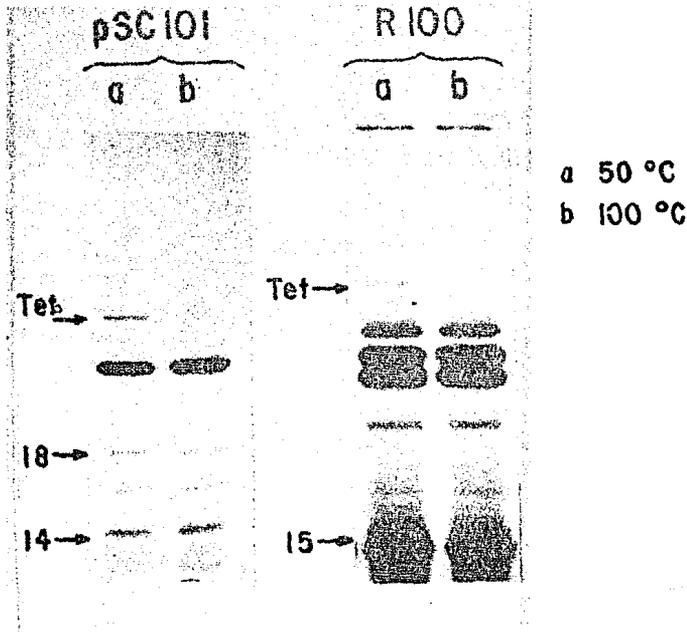


Figura 16B. Efecto de la temperatura sobre la visualización de la proteína TET de los plásmidos pSC101, 34 Kd y - R100, 36 Kd. Las temperaturas de solubilización - representadas son la temperatura óptima; carriles A y la temperatura máxima 100°C; carriles B. Cada -- uno de ellos corresponde a diferentes experimentos,

ron fijadas las condiciones óptimas para este experimento, los parámetros que se investigaron fueron:

a) Sensibilidad in vivo de Novobiocina

Con el propósito de conocer la dosis subletal de Novo para las cepas con los diferentes plásmidos in vivo, se llevó a cabo una curva de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de -- Novo (50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/ml}$).

En la Figura 17 puede observarse las curvas de crecimiento de dos cepas de minicélulas conteniendo a los plásmidos pSC101 y R100 respectivamente. Estas curvas fueron hechas para otros plásmidos utilizados en el trabajo. En general se observó que las cepas con los plásmidos R100 y pRSD1 son más sensibles a la Novo que las cepas con los plásmidos pSC101 y pBR322, pero aún en estos la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico, sigue siendo una dosis subletal.

b) Sensibilidad a Novobiocina in vitro

Se cuantificó la dosis óptima de Novobiocina para los experimentos de minicélulas con las cepas conteniendo los diferentes plásmidos. En la figura 18, se muestra este experimento para el caso de los plásmidos pSC101 y R100 en presencia de diferentes concentraciones de Novo (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$) previa inducción con Tc 1 $\mu\text{g/ml}$. Fué detectado que existe una baja notoria de la síntesis de proteínas con concentraciones mínimas de Novo en el caso de la cepa conteniendo al plásmido R100; esta baja no se observa en el caso del plásmido pSC101. Este dato repetido para la Tc (mayor sensibili--

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA P678-54 CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NOVOBIOCINA

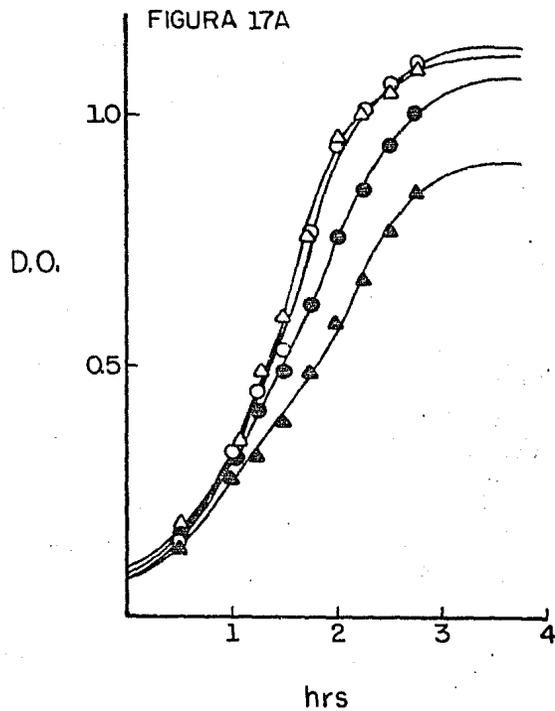


Figura 17A. Plásmido o curva 1: 678-54/pSC101;
 △ Curva: p678-54/pSC101 Novo 50 --
 µg/ml; ● curva 3; P678-54/pSC101 No-
 vo 100 µg/ml; ▲ curva 4: P678-54/
 pSC101 200 µg/ml.

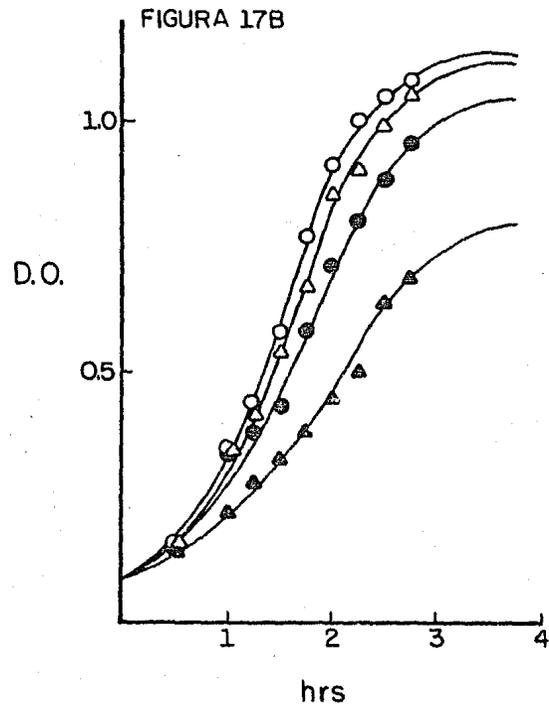


Figura 17B. Plásmido R100 o curva 1: P678-54/R100;
 △ Curva 2: P678-54/R100 Novo 50 µg/ml;
 ● curva 3: P678-54/R100 Novo 100 µg/ml;
 ▲ curva 4: P678-54/R100 Novo 200 µg/ml.

SENSIBILIDAD DE LAS MINICELULAS DE PSC101 Y R100 A TC Y NOV

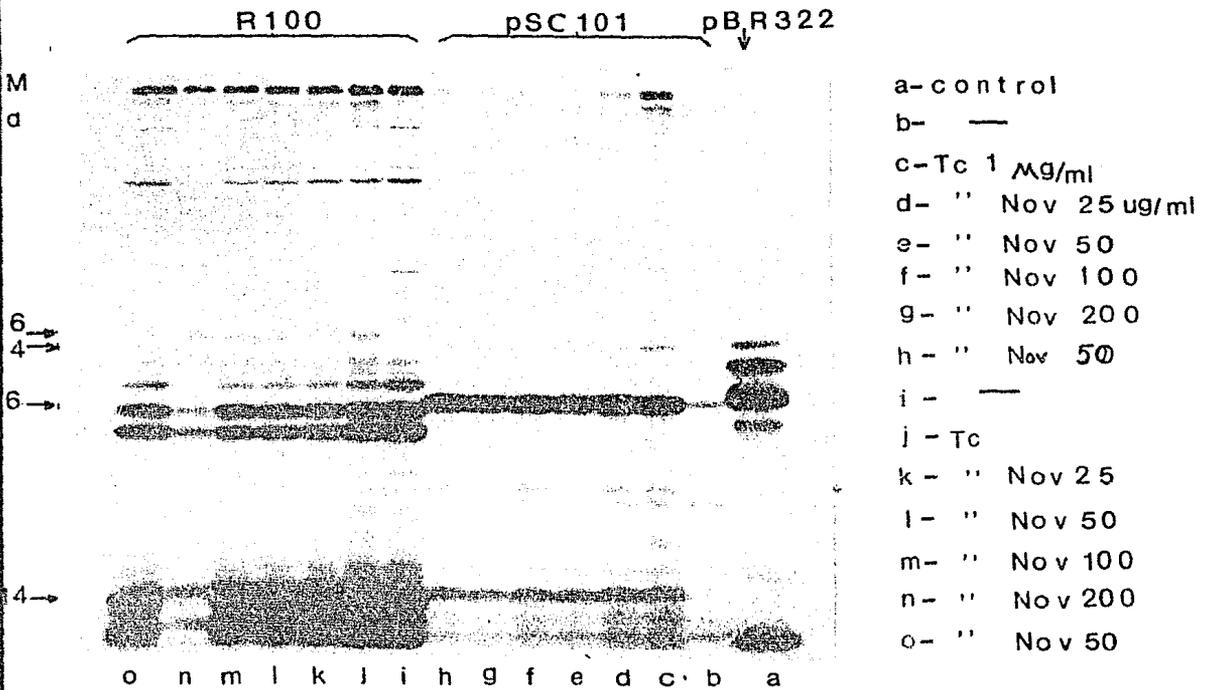


Figura 18. Sensibilidad a Noyo in vitro de los plásmidos - pSC101 y R100. Carril A, pBR322 control; carriles b-h pSC101; carriles i-o R100. Los carriles b e i plásmido sin inducir, en los siguientes carriles las minicélulas se indujeron con Tc -- 1 µg/ml y Novo a las concentraciones señaladas.

dad de la cepa que contenía el plásmido R100 que la del pSC101) - parece indicar que la presencia de los plásmidos como el R100, -- pRSD1 y RP4, modifican de alguna manera las características de la cepa P678-54 provocándole una mayor sensibilidad a ciertos anti-- bióticos como son la tetraciclina y la Novobiocina.

La dosis de Novo escogida para los posteriores experimentos fué - de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de células, ya que esta dosis es suficiente para obser-- var el efecto de este antibiótico sobre la expresión de las proteí-- nas de la resistencia a Tc y no disminuye en forma drástica la -- síntesis de proteínas totales.

Para tener plena autoridad de que el efecto que se observaba era - exclusivamente causado por la Novo y no un efecto sinérgico de --- Novo y Tc ya que la Tc era utilizada para la inducción, se obtuvo una curva de crecimiento de las cepas conteniendo a los plásmidos R100 y pSC101 en presencia de ambos antibióticos y cada uno de --- ellos por separado (Figura 19).

Los datos obtenidos en este experimento comprueban que la baja de síntesis de proteínas observada se debía exclusivamente a la Novo, ya que la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Tc no disminuye la síntesis de proteínas, no se observó un efecto sinérgico entre estos dos an-- tibióticos.

- d) Efecto de la DNA girasa sobre la expresión de los genes que codifi-- can para la resistencia a tetraciclina de los plásmidos pSC101, - R100 y pRSD1.

Una vez que se determinaron las condiciones óptimas, se procedió - a llevar a cabo el último objetivo de este trabajo. A las cepas

CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA P678-54 CON EL PLASMIDO R100

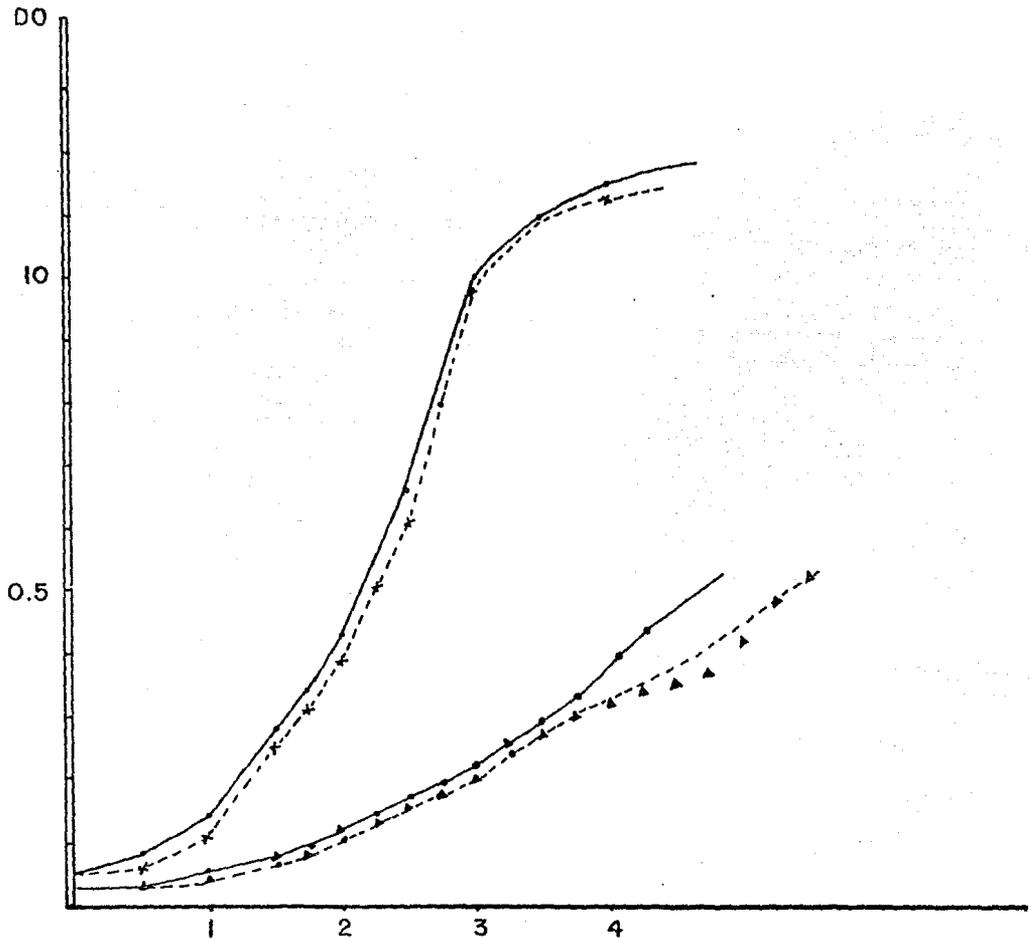


Figura 19. Curva de crecimiento de la cepa P678-54 con el plásmido R100. o curva 1: P678-54/R100; X curva 2: P678-54/R100 50 μ g Novo; o curva 3: P678-54/R100 100 μ g Novo; Δ curva 4: P678-54/R100 200 μ g Novo.

conteniendo los diferentes plásmidos, previamente inducidas con Tc (1-7 µg/ml), se les agregó Novo a la concentración anteriormente fijada (50 µg/ml), con el propósito de saber si el efecto causado por este antibiótico (relajar al DNA) tenía algún efecto sobre la expresión de los genes involucrados en la resistencia a Tc (Figuras 20 y 21).

Existe una proteína claramente dependiente de girasa común para todos los plásmidos analizados, lap roteína TET, aunque puede observarse que esta inhibición no es igual, es decir, algunas son más sensibles que otras. Además de esta proteína, podemos observar que en el plásmido pSC101 existe otra proteína dependiente de girasa, la proteína de 18 Kd (Figura 20). También en el plásmido pRSD1 se observa que la síntesis de la proteína inducible de alto peso molecular es inhibida en presencia de Novo.

Los resultados obtenidos fueron cuantificados por densitometría con el propósito de saber el porcentaje de inhibición de las proteínas dependientes de girasa.

Las densitometrías fueron hechas en un espectrofotómetro Beckman y las condiciones fueron las siguientes:

Longitud de onda	500 nm
sensibilidad	4
rapidez	5 cm/min

EFFECTO DE NOVOBIOCINA SOBRE pSC101

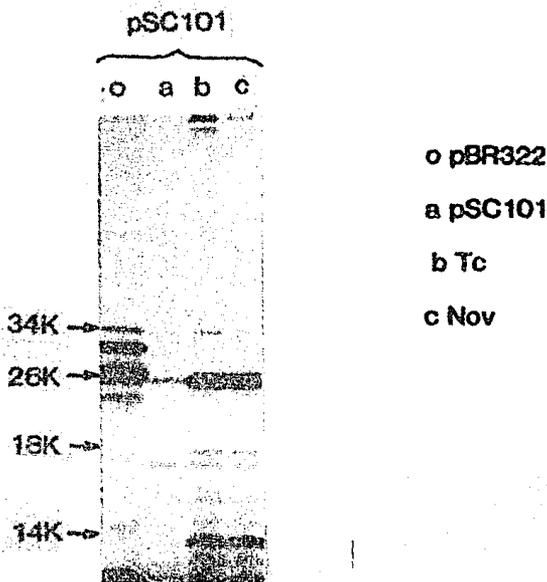


Figura 20. Efecto de Novo sobre la expresión de los genes involucrados en la resistencia a Tc del plásmido pSC101. Carril o: minicélulas con pBR322. Marcador de peso molecular; carril a; plásmido pSC101 sin inducir; -- carril b; plásmido pSC101 inducido con Tc 5 µg/ml; -- carril c: plásmido pSC101 inducido con Tc 5 µg/ml y Novo 200 µg/ml.

EFFECTO DE NOVIOBIOCINA SOBRE R100 Y pRSD-1

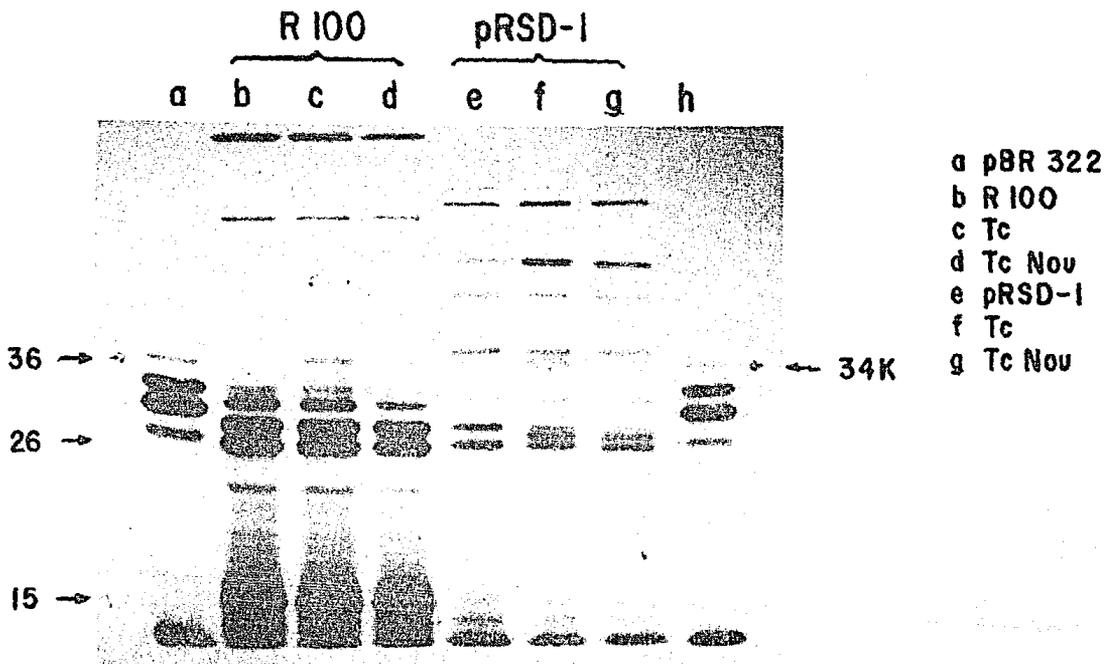


Figura 21. Efecto de Novo sobre la expresión de los genes involucrados en la resistencia a Tc de los plásmidos R100 y pRSD1. Carriles a, h: control de peso molecular plásmido pBR322; carril b: plásmido R100 sin inducir; -- carril c: plásmido R100 inducido con Tc 1 µg/ml; -- carril d: plásmido R100 Tc 1 µg/ml y Novo 50 µg/ml; - carril e: plásmido pRSD1 sin inducir; carril f: plásmido pRSD1 con Tc 1 µg/ml; carril g: plásmido pRSD1 - Tc 1 µg/ml y Novo 50 µg/ml.

El área de la curva fué calculada automáticamente por el espectrofotómetro y se tomó como el área entre valle y valle. Para calcular el porcentaje de inhibición de cada una de las proteínas se siguió el procedimiento siguiente: para evitar la sobreestimación de este dato, ya que se había dicho, la Novo tiene un efecto sobre la síntesis de proteínas totales, se calculó el porcentaje de inhibición con respecto a la misma proteína en ausencia de Novo y en presencia de ésta; una vez calculado la disminución, el dato fué corregido tomando como referencia una proteína independiente de girasa, que no varía en las diferentes condiciones (con y sin Novo). De esta manera fueron calculados los porcentos de inhibición de cada una de las diferentes proteínas como puede ver se en la Tabla VII.

Es posible observar que la inhibición causada por la DNA gira sa no es homogénea sino que al parecer existe un gradiente. Esto fué patente también al tratar de escoger la proteína control ya que nos encon tramos con una escala en la que ciertas proteínas son más o menos indepen dientes de otras.

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS QUE DEPENDEN DE GIRASA

Plasmido	Proteina	% de inhibicion
¹ pSC 101	34 Kd 18 Kd	95-97 % 40 %
² R 100	36 Kd	66 %
³ pRSD-1	34 Kd 70 Kd	56 % 34 %

VIII. DISCUSION

En el desarrollo de este trabajo se llevaron a cabo estudios sobre los mecanismos regulatorios que intervienen en la resistencia a Tc.

Para la mayoría de los antibióticos, la resistencia mediada por plásmidos se caracteriza por la presencia de un solo determinante característico; es decir, de una secuencia de DNA similar que codifica para una o más proteínas. Sin embargo para Tc hay cuando menos cuatro diferentes determinantes de resistencia (29). Esta característica condujo a formular varias preguntas con el propósito de un mayor conocimiento de los aspectos regulatorios y de las características físicas de la resistencia.

Cabe mencionar que algunos resultados que se reportan en este trabajo confirman los datos de otros autores (29) en cuanto a varias de las características de las proteínas involucradas en la resistencia; otros, sin embargo, no concuerdan con lo reportado. A continuación se discutirán algunos puntos de interés sobre los diferentes aspectos que fueron abordados en el trabajo, para concluir con una discusión general sobre los aspectos regulatorios del sistema y perspectivas del trabajo.

Aspectos físicos

Se estudió la expresión inducibilidad y peso molecular de las proteínas relacionadas con la resistencia a Tc de los plásmidos R100, PRSD1 y pSC101 (Figura 11). Dos puntos nos llamaron la atención.

- 1) Para el caso del plásmido pSC101, las proteínas encontradas (Figura 11) concuerdan con lo que ha sido reportado por otros autores (57). Sin embargo, en estos reportes se considera que la -- proteína de 18 Kd, que se sabe que es importante para la resis-- tencia, es constitutiva; es decir, existe expresión de ella aún en ausencia de antibiótico. En nuestro sistema se observó que -- esta proteína es inducible. Este dato se reprodujo en todos los experimentos hechos bajo las mismas condiciones; por lo que proponemos que la proteína de 18 Kd es inducible al igual que las -- otras proteínas de pSC101 involucradas en la resistencia a Tc -- (Figura 15). Esta discrepancia con lo reportado por otros autores podría deberse:

Primero, a que esta proteína pudiese comigrar con otra(s) proteí-- na(s) enmascarándose, siendo catalogada como constitutiva. Sin embargo, esta explicación es poco probable ya que existen estu-- dios de deleciones del gen con los que se le ha identificado ple-- namente (64). Segundo, que bajo ciertas condiciones como serían diferentes medios de cultivo, edad del cultivo, etc., la expre-- sión de la proteína de 18 Kd pueda comportarse de manera diferen-- te. No tenemos datos que apoyen esta explicación en el trabajo sin embargo, es posible que la expresión de la proteína varíe -- con el medio de cultivo utilizado (S. Levy comunicación personal).

- 2) Para el plásmido pRSD1, se observaron dos proteínas que intervie-- nen en la resistencia a Tc (25 y 34 Kd) previamente reportadas - (90) y una tercer proteína inducible con la presencia de Tc, de

alto peso molecular (≈ 70 Kd), que no ha sido reportada. Debido a que los estudios en este plásmido son bastante recientes, es posible que esta sea una proteína que intervenga en la resistencia a Tc no identificada, en cuyo caso sería el primer reporte de una proteína de tan alto peso molecular involucrada en la resistencia. Se han contemplado otras posibles explicaciones para este resultado interesantes de enunciar. Que esta proteína se encuentre codificada en el plásmido PRSD1 (en el transposón menor o fuera de él) pero no intervenga en la resistencia a Tc y que el aumento en la síntesis de proteína se deba al aumento de la transcripción de uno de los genes inducibles (26 ó 34 Kd) y que dicha transcripción se continúe hacia el gen de la proteína de 70 Kd por la falta de un terminador eficiente, esto ha sido comprobado para algunos promotores fuertes como el del RNA1 del plásmido --- pBR322 (91) y el promotor antitet (92). Otra posibilidad es que esta proteína no se encuentre codificada en el transposón y no intervenga en resistencia al antibiótico, pero que su expresión se induzca con la presencia de Tc, es decir, que cualquiera que sea el mecanismo de inducción de la resistencia, no sea exclusivo para los genes que intervienen en ella. Esta posibilidad ha sido planteada ya que para el caso de la proteína de 15 Kd del plásmido R100 (76), ya que al parecer se encuentra fuera del Tn10 y parece no tener ningún efecto en la resistencia.

Este hecho plantea una posibilidad interesante y es que la presencia de Tc pueda inducir la expresión de otros genes no relacionados con la resistencia.

Un punto más que nos llamó la atención fué el comportamiento de las proteína TET (34-36 Kd). Estas proteínas tienen ciertas características que la hacen de difícil visualización en geles de poliacrilamida (14). El hecho de que las proteínas TET sean membranales, probablemente hidrofóbicas y por lo tanto difíciles de solubilizar, pudiera ser responsable de este comportamiento. Para ello se probaron diferentes condiciones de las cuales algunas dieron resultados positivos, como puede verse en los resultados (Figura 15).

Al parecer las diferentes proteínas TET de los plásmidos utilizados pueden ser modificadas por diferentes condiciones de temperatura, medio de cultivo, etc. Cuando las muestras son solubilizadas a temperaturas entre 35° y 65°C las proteínas TET son observadas sin ninguna dificultad; sin embargo, la banda correspondiente a esta proteína no se observa con la misma intensidad si las muestras son incubadas a temperaturas por arriba de los 65°C. Estos datos nos sugieren que en estas condiciones las proteínas solubilizadas forman complejos de alto peso molecular que precipitan, los cuales no entran al gel de acrilamida. Otros autores han observado que la presencia de compuestos como el SDS y el mercaptoetanol pueden estimular este proceso, por lo tanto una posible solución para la visualización de la proteína TET sea que la solubilización de las muestras sea a una temperatura debajo de los 65°C y disminuyendo la cantidad de SDS y mercaptoetanol de las muestras. Sin embargo, es posible que este proceso sea más complejo y que existan varios factores que provoquen que esta proteína sea sensible a agregarse. Como se mencionó, se tienen reportes similares con proteínas de cromóforos de bacterias fotosintéticas, que son proteínas membranales como la proteína TET y que son de difícil visualiza-

ción (93,94). Se podría sugerir que proteínas membranales, como son los ejemplos que han sido mencionados, sean susceptibles a formar agregados de alto peso molecular bajo las condiciones estándar de solubilización.

El último punto que será abordado en cuanto a la caracterización física, es el hecho de que existe una diferencia grande en la síntesis de proteínas de minicélulas de la cepa P678-54 a Tetraciclina y Novobiocina, dependiendo del plásmido que contengan. Las minicélulas con pSC101 fueron más resistentes que las minicélulas que contenían el plásmido R100, RP4 o pRSD1. Este efecto no se observó en cultivos de la cepa P678-54 con los diferentes plásmidos (Figura 18 y 19). Al parecer la presencia de ciertos plásmidos como son el R100, pRSD1 y RP4 provocan que una misma cepa tenga una respuesta diferente a un antibiótico; probablemente por que codifican para la presencia de pillis, estructuras involucradas en la conjugación, los cuales podrían ser responsables de este fenómeno al alterar la permeabilidad celular. Sin embargo si esto fuera cierto debería de reflejarse en la cepa P678-54 y no solamente en las minicélulas de la misma cepa. Una posible explicación es que la membrana de las minicélulas se encuentre alterada (49) y que por lo tanto la presencia de pilli en estas "células" provoque una mayor entrada del antibiótico lo que no ocurre con las células normales.

Aspectos Regulatorios

Un fenómeno observado en este trabajo, es que dependiendo de la fase de crecimiento de cultivo de la cepa P678-54 con los diferentes plásmidos, se presentan diferencias en el nivel inducible de resistencia a Tc. Como se ve en los resultados, existe una etapa óptima de inducción de

la resistencia que es la fase exponencial tardía (Figura 12).

Este resultado sugiere que existen cambios en la célula dependiendo de su estado fisiológico que modifican la expresión de las proteínas de resistencia o bien el mecanismo de resistencia. Se sabe que modificaciones en los niveles de ciertos metabolitos como AMPc, GMPc, ppGpp, etc. pueden modificar la expresión de algunos genes (95). De especial interés es el caso del ppGpp. (Guanosina-5'-difosfato-2'(3')-difosfato) el cual es un catabolito que aumenta durante la fase exponencial y provoca el aumento de transcripción de ciertos genes, tal vez por modificar la interacción de la RNA polimerasa- promotor (96).

Es también posible que este estado óptimo de inducción de la resistencia se deba a cambios membranales de la célula que ocurren durante las diferentes etapas de crecimiento del cultivo. Estos cambios pueden provocar que la proteína TET, que parece ser en buena parte la responsable de la resistencia, se intercale en la membrana con una mayor eficiencia o de forma tal que aumente la actividad de la proteína de bombear el antibiótico hacia afuera. Existen diferentes reportes sobre las modificaciones que sufre la membrana con respecto al tiempo, como esterificaciones en los ácidos grasos de los fosfolípidos que inducen cambios en la fluidez de la membrana (97).

En cuanto a la dependencia a girasa, que fué el objetivo principal de este trabajo se observó que todos los plásmidos estudiados contaban con una proteína común (34 ó 36 Kd) denominada TET sensible a Novobiocina; es decir, que para su expresión es necesario que el plásmido se encuentre superenrollado. Esta sensibilidad a Novobiocina de las diferen--

tes proteínas medida como el porcentaje de inhibición de la síntesis de -- proteínas no es homogénea, al parecer existe una gradación en cuanto a su dependencia a girasa (Tabla VIII). Por lo anterior proponemos que un gen no es dependiente o independiente de girasa sino que dentro de aquellos - genes que son afectados al relajar el DNA existen unos que son más afectados que otros.

Para descartar que este fenómeno pudiera deberse a alguna variable - no controlada en el experimento sería necesario homogenizar lo más posi-- ble los diferentes determinantes estudiados. Una de estas variables que pudiera ser importante, es la diferencia en tamaño de los diferentes plásmidos:

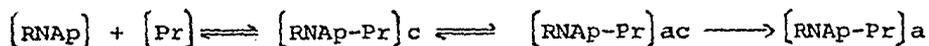
pSC101	→	5 Mdal
R100	→	70 Mdal
pRSD1	→	30 Mdal

De tal manera que en los plásmidos como el R100, la concentración de Novobiocina utilizada no sea suficiente para relajarlos al mismo nivel que a los plásmidos de peso molecular pequeño como el pSC101; esto considerando que la DNA girasa tiene sitios preferenciales para actuar, y que para plásmidos de alto peso molecular sería mayor la cantidad de moléculas de DNA girasa que interaccionaran con ellos que con los plásmidos - de peso molecular pequeño. Esta variable podría desaparecer si se homogenizara el tamaño de los diferentes determinantes de resistencia, que podría lograrse si los diferentes determinantes se transfirieran a un replicón común como el plásmido pBR322 (85), aquellos determinantes que son por sí solos sumamente grandes (Tn10 y el Tn 1721) podría ser utilizada -

Únicamente la zona necesaria para la resistencia.

Como se mencionó en la introducción, no existe hasta la fecha un modelo aceptado para la dependencia o independencia de un gen e la DNA girasa. Sin embargo podría explicarse por las características de la región promotora o de las regiones aledañas a ella. Aparentemente existe un efecto en el nivel de transcripción de los genes dependientes de girasa cuando se encuentran relajados en comparación a cuando se encuentran superenrollados; esto puede deberse a que se encuentra afectada la formación del complejo abierto o del complejo cerrado del inicio de la transcripción.

La denotación complejo cerrado involucra el momento en que la RNA polimerasa reconoce y se une al promotor^{av} y el complejo abierto el momento en que se inicia la transcripción y es un estado irreversible según el modelo propuesto por McKlure (98):



donde:

- $[RNAP]$ = concentración de RNA polimerasa
- $[Pr]$ = concentración promotor
- $[RNAP-Pr]_c$ = concentración complejo cerrado
- $[RNAP-Pr]_{ac}$ = concentración estado de transición entre el complejo cerrado y el complejo abierto
- $[RNAP-Pr]_a$ = concentración complejo abierto

Es posible que aquellos genes cuyos promotores tengan secuencias menos similares a la consenso o en los que la distancia entre las re

giones -35 y -10 sea diferente a la consenso sean dependientes de girasa. Otra posibilidad es que el porcentaje de G-C en la zona del promotor provoque que un gen sea dependiente de girasa; debido a que en el caso de un contenido mayor de G-C la cadena de DNA sería más estable y por lo tanto la energía necesaria para desnaturalizar el DNA sería mayor; teniendo mayor dependencia a medida de que se alejen de la secuencia consenso (secuencia o distancia) o tengan un mayor % de G-C.

Para el caso de la proteína TET del plásmido pSC101 que es inhibida en presencia de Novobiocina en un 95%, se observa que su promotor es prácticamente consenso en cuanto a secuencia y distancia, siendo a pesar de ello muy sensible a girasa:

	-35	17 pb	-10	+1
prom. TET:	ATGTTTGACAGCTTATCGATAAGCTTTAATGCGGTA			
prom. cons:	TTGACA	-- 17 pb --	TATAATG	CAT

El % de G-C en la zona de este promotor es de 39%, si se compara con un gen independiente de girasa, como sería el de lactamasa que tiene un 34% de G-C, no se tiene una diferencia significativa que explique la dependencia de girasa por el promotor tet.

Es patente que a partir de estos datos no es posible adjudicar la dependencia del gen tet, por lo menos para el caso del pSC101, a ninguno de los factores propuestos, ni a los propuestos por otros autores (46). Al parecer, el porque un gen sea dependiente de girasa sigue siendo hasta la fecha una pregunta que requiere mayor cantidad de estudios.

El hecho de que en los tres determinantes de resistencia estudiados exista una proteína que dependa de girasa, nos habla de un factor común a los tres diferentes genes. Ya que la presencia de tetraciclina provoca en todos ellos un aumento en la transcripción, es posible que la zona regulatoria de estos tres genes sea semejante, no en secuencia, pero sí en estructura.

A pesar de que no existe hibridización entre los diferentes determinantes, es decir, que sus secuencias de DNA son diferentes, por lo menos en bacterias gram negativas, se observan claras similitudes entre ellos tanto en el tipo de proteínas que codifican, la función de estas, su tamaño, y como se vio en su comportamiento a otros factores como el superenrollamiento de la molécula.

Lo anterior puede ser explicado a través de una convergencia o una divergencia evolutiva, la primera nos parece más factible ya que sus secuencias son completamente diferentes.

Como ya se había mencionado, la resistencia a la mayoría de los antibióticos mediada por plásmidos se encuentra representada por la presencia de un solo determinante de resistencia; cabe preguntarse pues porqué para la resistencia a tetraciclina existen cuando menos cuatro diferentes determinantes de resistencia para bacterias gram negativas; que tipo de ventaja selectiva confirieron este tipo de mecanismo sobre otros posibles que sin lugar a dudas surgieron, de forma tal que a través de diferentes vías se llegara a un mecanismo semejante. Probablemente los mecanismos de modificación del sitio blanco no sean viables ya que pudie-

sen ser letales para la célula, o bien que para el caso de este antibiótico, que produce una serie de efectos secundarios, la modificación del sitio blanco no sea suficiente para la resistencia y el único mecanismo posible es el que encontramos en la actualidad; sin embargo quedarían todavía posibilidades como la modificación de la tetraciclina.

Se ha especulado sobre el origen de la resistencia a antibióticos mediada por plásmidos, pudiese provenir de la cepa productora del antibiótico. Para el caso de la resistencia a tetraciclina, la existencia de varios determinantes de resistencia podría ser explicada a partir de las diferentes cepas productoras de tetraciclina que son Streptomyces de diferentes géneros.

Al parecer ninguno de los determinantes usados en el trabajo constituyen un operón, ya que contienen regiones promotoras diferentes para cada una de las diferentes proteínas de las cuales unas son dependientes de girasa, hecho que había sido propuesto por otros autores para el caso del plásmido pSC101. En los datos presentados en este trabajo parece que este mecanismo es común para los diferentes determinantes.

Se ha observado la existencia de promotores traslapados para el caso de la proteína TET del plásmido pSC101 y más recientemente para las clases A y B de Levy a las que corresponden el Tn1521 y el Tn10 respectivamente. Al parece las tres proteínas TET pertenecientes a los diferentes determinantes presentan promotores traslapados con los genes de otras proteínas que en algunos casos pueden ser el represor del sistema.

Postular un mecanismo general para la resistencia de los diferentes determinantes no es fácil, ya que en algunos de ellos existen distintas proteínas que intervienen en la resistencia. Sin embargo, existen puntos semejantes para todos ellos como son:

- La expresión de las proteínas de resistencia a tetraciclina se encuentra regulada negativamente por la presencia de un represor.
- Al parecer para todos los determinantes, la proteína TET es una de las más importantes para la resistencia.
- Las proteínas TET presentan promotores traslapados; sin embargo, para el caso del Tn10 y el Tn1721 el gen de esta proteína se encuentra traslapado con el gen de la molécula represora y para el caso del pSC101 se encuentra traslapado con el gen de la proteína de 14 Kd la cual no parece tener importancia en la resistencia.

Es probable que la entrada del antibiótico a la célula provoque la modificación de la molécula represora de tal manera que no pueda interactuar en el sitio operador de las diferentes proteínas permitiendo su expresión. Probablemente esta molécula represora no sea exclusiva para las proteínas involucradas en la resistencia y pueda interactuar con otros genes que no se cuentren involucrados en la resistencia, modificando su expresión. Esto podría explicar el porqué proteínas como la de 15 Kd del Tn10 y la de 14 Kd del pSC101 se inducen en presencia de Tc.

Un punto interesante para el caso del Tn10 clase A y Tn1721 clase B es que las moléculas postuladas como represoras (25 y 26 Kd respectivamente) se encuentran involucradas en el mecanismo de resistencia y si se deletan, además de provocar constitutividad al sistema, disminuye -

el nivel de resistencia de la cepa.

Como conclusión final del trabajo quisiera remarcar que el estudio de la resistencia a antibióticos mediada por plásmidos y en especial la resistencia a tetraciclina constituyen un campo abierto para la investigación ya que existen una gran cantidad de preguntas sumamente interesantes por contestar en el aspecto regulatorio, evolutivo, de relaciones filogenéticas, etc.

En este trabajo se llevaron a cabo una serie de estudios preliminares enfocados a tratar de entender el mecanismo de resistencia a tetraciclina de los diferentes determinantes utilizados, fué encontrada una similitud en cuanto a la dependencia de la proteína TET a girasa, la cual es una más a las ya encontradas en cuanto a su función.

BIBLIOGRAFIA

1. Broda, P. (1979). PLASMID. W.H. Freeman and Company Limited
2. Wantanabe, T. (1968) Infectious drug resistance in enteric bacteria. New Engl. J. Med. 275: 88-895.
3. Mitsuhashi, S., Harada, K. and Hashimoto, H. (1960). Multiple resistance of bacteria and transmission of drug-resistance to other strains by mixed cultivation. Japanese Journal of Experimental Medicine 30, 179-184.
4. Datta, N.M.D. (1964) Infectious drug resistance. British Medical Bulletin 21, 3: 254-259.
5. Chandler, M., Clerget, M., and Card, L. (1980) IS1-Promoted events associated with drug resistance plasmids. C.S.H.S.Q.B. 1: 157-165.
6. Walker, M.S. and J.B. Walker (1970) Streptomycin biosynthesis and metabolism enzymatic phosphorylation of dihydrostreptobiosamina moities of dihydrostreptomycin phosphate and dihydrostreptomycin by Streptomyces extracts. J. Biol. Chem. 245: 6683-6689.
7. Benveniste, R. and Davies, J. (1973). Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 (No. 8): 2276-2280.
8. Friend, E.J. and Hopwood, D.A. (1971) The linkage map of Streptomyces rimosus. J. Gen. Microbiol. 68: 187-197.
9. Freeman, R.F. and Hopwood, D.A. (1978). Unstable naturally occurring resistance to antibiotics in Streptomyces. J. Gen. Microbiol. 106: 377-381.
10. Boronin, A.M. and Sadovnikova, I.G. (1972) Elimination by acridine dyes of oxytetracycline resistance in Actinomyces rimosus. Genetika 8: 174-176.

11. Davies, J. and Smith, I.D. (1978) Plasmid determined resistance to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 469-518.
12. Horinouchi, S. and Weisbrun, B. (1980) Posttranscriptional modification of mRNA conformation: Mechanism that regulates erythromycin induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, No. 12: 7079-7083.
13. Hošťálek, X., Blumaverová, M. and Vanek, Z.: (1981) Genetic problems of the biosynthesis of tetracycline antibiotics. *Adv. Biochem. Eng.* 20, No. 3: 13-63.
14. Chrora, I. and Howe, T.G.B. (1978) Bacterial resistance of the tetracyclines. *Microbiol. Reviews* 42, 4: 707-724.
15. Henning, V., Schmidmagr, W. and Hindennach, T. (1977) Major proteins of the outer cell envelope membrane of *Escherichia coli* K-12: Multiple species of protein I. *Mol. Gen. Genet.* 154: 293-298.
16. McMurry, L., Cullinane, C.J., Richard, E. Petrucci, Jr., and Stuart B. Levy (1981). Active uptake of tetracycline by membrane vesicles from susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 20: 317-
17. Nelson, D.L. and Kennedy, E.P. (1982) Transport of magnesium by a repressible and non-repressible system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1091-1093.
18. Mylnikova, S.I., and Plaknunov, U.K. (1973). Oscillatory character of antibiotic transport regulation in a chlorotetracycline resistant strain of *S. aureus* 209. *Antibiotiki (Moscow)* 18, 293-298.
19. Hash, H. J. (1972) Antibiotic mechanisms. *Ann. Rev. Pharmacology.* 22: 35-56.
20. Albert, A. & Rees, C.W. (1956) Avidity of the tetracyclines for metallic cations. *Nature Lond.* 177: 433.

21. Higuchi, T. and Bolton, S. (1959), The solubility and complexing properties of oxytetracycline and tetracycline. III. Interactions in aqueous solutions with model compounds, biochemicals, chelates and hexametaphosphate. *J. Ann. Pharm. Assoc. Sci.* 48: 557.
22. Benbough, E.J. and Morrison, G.A. (1967). The molecular basis of an inhibition by tetracyclines. *J. Gen. Microbiol.* 49: 469-485.
23. Isaki, K., Kiushi, K. and Arima, K. (1966). Specificity and mechanism of tetracycline resistance in a multiple drug-resistant strain of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 91: 628-633.
24. Franklin, T.J. (1967) Resistance of Escherichia coli to tetracyclines. *Biochem. J.* 105: 371-378.
25. Levy, S.B., McMurray, L., Onigllan, P., Saundorts, R.M. (1977) Plasmid mediated tetracycline resistance in E. coli. Drews J. Hogenaver G. (eds) *Topics in Infectious Diseases.* 2 p. 181-203.
26. Chabbert, A.I., and Scavizzi, R.M. (1976) Chelocardin - inducible resistance in Escherichia coli bearing R plasmids. *Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy.* 9, 1: 36-41.
27. Foster, T.J. and Walsh, A. (1974) Phenotypic characterization of R-factor tetracycline resistant determinants. *Gen. Rev. Camb.* 24: 333-343.
28. McMurry, L., Petrucci, R.E.Jr. and Levy, S.B. (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3974-3977.
29. Mendez, B., Tachibana, Ch. and Levy, S.B. (1980) Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. *Plasmid.* 3: 99-108.
30. Huey-Larq, Y., Zubay, G. and Levy, S. B. (1976). Synthesis of and R plasmid protein associated with tetracycline resistance is negatively regulated. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 5: 1509-1512.

31. Gayda, R.C., Tanabe, J.H., Knigge, K.M. and Marrovitz, A. (1979) Identification by deletion analysis of an inducible protein required for plasmid pSC101-mediated tetracycline resistance. *Plasmid* 2: 417-425.
32. Smith, C.L. (1978) Promoter specific inhibition of transcription by antibiotics which act of DNA gyrase 275, 5: 420-423.
33. Kornberg, A. (1980). DNA replication. Freeman, San Fco. 2o. Ed.: 307-317 p-p.
34. Watson, J.D. and Crick, F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic Acids. *Nature* 171: No. 4356: 737-738.
35. Cozzarelli, N.R. (1980) DNA gyrase and the superciling of DNA. *Science* 207: 953-960.
36. Mattern, R.M. and Sardiero, A.D. (1981) Dependence of mammalian DNA synthesis of DNA superciling. III. *Biochem. et Biophys. Acta* 653: 248-258.
37. Sugino, A., Higgins, N.P., Brown, O.P., Peebles, L.C. (1978). Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 10: 4838-4842.
38. Crick, F.H.C. (1976) Linking numbers and nucleosomes. *Mathematics and Biochemistry* 73, 8: 2639-2643.
39. Brown, P.O. y Cozzarelli, N.R. (1979). A topoisomerasa from Escherichia coli related to DNA gyrasa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6110-6114.
40. Drilica, K. and Snyder, M. (1978) Superhelical *Escherichia coli* DNA: relaxation by connernycin. *J. Mol. Biol.* 120: 145-154.
41. Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H.O. and Hash, H.A. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3872-3876.

42. Marians, K.J., Ikeda, J.E., Schlagman, S., and Hurwitz, J. (1977) Role of DNA gyrase in ϕ x replicative-form replication in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5: 1965-1968.
43. Hays, B.J. and Boennek, S. (1978) Antagonists of DNA gyrase inhibit repair and recombination of UV-irradiated phase λ . Biochemistry 75, 9: 4125-4129.
44. Watson, D.M. (1981) The role of DNA topoisomerase I in transcription an transposition. TIBS
45. Kreuzer, N.K., McEntee, K., Geballe, P.A. y Cozzarelli, R.N. (1978). Lambda transducing phages for the nal A gene of Escherichia coli and conditional lethal nal A mutations. Mal. gen. Genet. 167: 129-137.
46. Sanzey, B. (1979) Modulation of gene expression by drugs affecting deoxyribonucleic acid gyrase. J. Bacteriol. 138: 1: 40-47.
47. Yang, H.-L., Heller, K., Gellent, M., y Zubay, G. (1979). Differential sensitivity of gene expression in vitro to inhibitors of DNA gyrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 7: 3304-3308.
48. Gómez, E.M.C. (1981) Effect of nalidixic acid and novobiocin on pBR322 genetic expression in Escherichia coli minicels. J. Bacteriol. 148, 3: 745-752.
49. Curtiss, R., III. (1965) Chromosomal aberrations associated with mutations to bacteriophage resistance in Escherichia coli. J. Bacteriol. 89: 28-40.
50. Alder, H.T., Fisher, W.D., Cohen, A. and Hardigree, A.A. (1966) Miniature Escherichia coli cells deficient in DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57: 321-326.
51. Ronald, J.S., Anderson P., Allison, D., and Curtiss, R. III (1973) Molecular nature of R-factor deoxyribonucleic acid isolated from Salmonella typhimurium. J. Bact. 114: 1328-1335.

52. Hirota, Y., Rytter, A., Jacob, F. (1968) Thermosensitive mutants of E. coli affected in the processes of DNA synthesis of cellular division. Cold. Sp. Harb. Symp. Quant. Biol. 33: 677-693.
53. Setlow, H.R., et al. (1973) Miniature hemophilus influenzae cells. J. Bacteriol. 114: 1084-1086.
54. Meagher, B.R. (1977) Protein expression in E. coli minicells by recombinant plasmids. Cell. 10: 521-536.
55. Manwaring, D.J. and Fuchs, J.A. (1977) Nucleoside triphosphate pools in minicells of Escherichia coli. J. Bacteriol. 130, 2: 960-962.
56. Cohen, A., Fisher, W.D., Curtiss, R. III, and Alder, H.I. (1968) The properties of DNA transferred to minicells during conjugation. CSHSQB. 33: 635-641.
57. Meagher, R.B., Tait, R.C., Betlach, M. and Boyer, H.W. (1977) Protein expression in E. coli minicells by recombinant plasmids. Cell, 10: 251-536.
58. Yang, H.-L. and Zubay, G. (1973) Synthesis of arabinosa operon regulator protein in a cell-free system. Mol. gen. Genet. 122; 131-136.
59. Sancar, Azis, Hack, A.D. and DeanRupp, W. (1979) Simple method for identification of plasmid coded protein. Journal of Bacteriol. 137, 1: 692-693.
60. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W. and Helling, R.B. (1973) Construction of biological functional bacterial plasmids in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 3240-3244.
61. Cohen, S.N., and Chang, A.C.Y. (1977) Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. J. Bacteriol. 132: 734-737.
62. Tait, R.C. and Boyer, H.W. (1978) On the nature of tetracycline resistance controlled by the plasmid pSC101. Cell 13: 73-81.

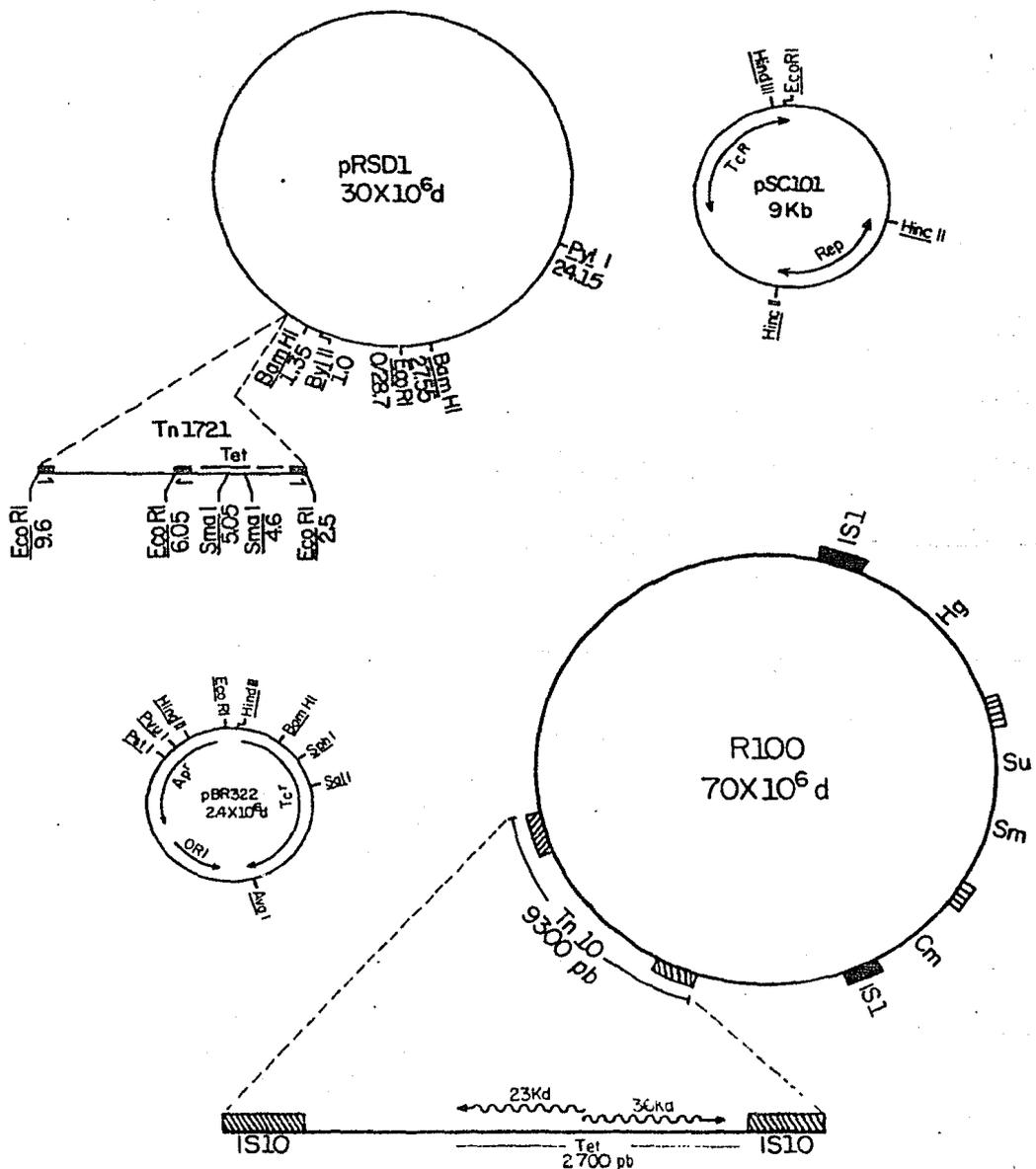
63. Tait, R.C., Heyneker, H.L., Rodriguez, R.L., Bolivar, F., Covarrubias, A., Betlach, M. and Boyer, H.W. (1978) Tetracycline resistance conferred by pSC101, pMB9 and their derivatives. Microbiology. D. Schlessinger Ed. Ann. Soc. for Microbiology, Washinton, D.C.: 174-176.
64. Tait, C.R. and Boyer, H.W. (1978) On the nature of the tetracycline resistance controlled by the plasmid pSC101. Cell 13: 73-81.
65. Tait, C.R., Rodriguez, L.R., and Boyer, H.W. (1977) Altered tetracycline resistance in pSC101 recombinant plasmids. Molec. Gen. Genet. 151: 327-331.
66. Kleckner, N. (1981) Transposable elements in prokaryotes. Ann. Rev. Genet. 15: 341-404.
67. Cohen, S.N. and Shapiro, J.A. (1980) Transposonable genetics elements. Sci. Am. 242: 36.
68. Kleckner, N., Barker, D., Ross, D., and Botstein, D. (1978) Properties of the translocable tetracycline resistance element Tn10 in E. coli and bacteriophage λ . Genetics 90: 427-450.
69. Ross, G.D. (1979) Physical structures of Tn10 -promoted deletions and inversions: Role of 1400 bp inverted repetitions. Cell. 16: 721-731.
70. Kleckner, N., Foster, T.J., Davis, M.A., Hanley-Way, S., Halling, S.M., Lundblad, V. and Takeshita, K. (1981) Cold Spring Harbor. Tomo I.
71. Taylor, D.P., Greenberg, H., Rownd, R.H. (1977) Generation of miniplasmids from copy number mutants of the R plasmid NRL. J. Bacteriol. 132: 986-995.
72. Colcman, D.C. Foster, T.J. (1981) Analysis of the reduction in expression of tetracycline resistance determined by transposon Tn10 in multicopy state. Mol. Gen. Genet. 182: 171-177.

73. Yang, H., Zubay, G. and Levy, S. (1976) Synthesis of and R plasmid protein associated with tetracycline resistance in negatively regulated. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1509-1512.
74. Wray, L.V., Richard, J.R., Jorgensen, A. and Reznikoff, W.S. (1981) Identification of the tetracycline resistance promoter and repressor in transposon Tn10. J. Bacteriol. 14, No. 2: 297-304.
75. Zupancic, T.J., King, S.R., Pogue-Geile, K.Z. and Jaskunas, S.R. (1980). Identification of a second tetracycline-inducible polypeptide encoded by Tn10. J. Bacteriol. 144: 346-355.
76. Jorgensen, R.A. and Reznikoff, W.S. (1979) Organization of structural and regulatory genes that mediate tetracycline resistance in transposon Tn10. J. Bacteriol. 138: 705-714.
77. Schmitt, R., Altenbuchner, J. and Grinsted, J. (1981) Complementation of transposition functions encoded by transposons Tn501 (Hg^R) and Tn1721 (Tec^R) in Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial plasmids.
78. Burkardt, H.J., Mattes, R.J., Schmid, R., and Schmitt, K. (1978) Properties of two conjugative plasmids mediating tetracycline resistance, raffinose catabolism and hydrogen sulphide production in E. coli. Mol. Gen. Genet. 166: 75-84.
79. Schmitt, R., Bernhard, E. and Mattes, R. (1979) Characterization of Tn1721, a new transposon containing tetracycline resistance genes capable of amplification. Mol. gen. Genet. 172: 53-65.
80. Foster, J. T., Davis, A.M.; Roberts, E.D.; Takeshita, K. and Kleckner, N. (1981) Genetic organization of transposon Tn10. Cell, 23: 201-213.
81. Miller, H.J. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor. 2 ed., New York 11724.

82. Cohen, S.N.; Chang, A.C. and Hsu, L. (1972) Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 69: 2110-2114.
83. Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Ac. Res. Vol. 7 (6): 1513-1523.
84. Laemlli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
85. Bolivar, F.; Rodriguez, R.L.- Betlach, M.C. and Boyer, H.W. (1974). Construction and characterization of new cloning vehicles I ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pHI89. Gene, 2: 75-93.
86. Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Biol. 98: 503-517.
87. Sfieglitz, H., Fonseca, R., Olarte, J. y Jupersztoch-Portnoy, Y. M. (1980) Linkage of heat-stable enterotoxin activity and ampicillin resistance in a plasmid isolated from an Escherichia coli strain of human origin. Infect. Immun. 30: 617-620.
88. Davis, D.B. and Helnstetter, C.E. (1973) J. Bacteriol. 114: 294-299.
89. Cohen, S.N., Silver, R.P., Coubrey, M.D., A.E. Sharp, D.A. (1971) Studies on the molecular nature of R-factors. Ann. N.Y. Acad. Sci. 182: 172-187.
90. Altenbuchner, J., Schmid, K. and Schmitt, R. (1983) Tn1721 - Encoded tetracycline resistance: Mapping of structural and regulatory genes mediating resistance. J. of Bacteriol. 153: 116-123 pp.
91. Tomizawa, J-I., Stoh, T., Selzer, G. y Som, T. (1981) Inhibition of Col EI RNA Primer formation by a plasmid specified small RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 pp 1421-1425.

92. Stüber, D. and Bujard, H. (1981) Organization of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACYC184. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 167-171 pp.
93. Shepherd and Kaplan (1978) Effect of heat and 2-mercaptoethanol on intracytoplasmic membrane polypeptides of *Rhodospseudomonas sphaeraedes*. J. Bacteriol. 135: 656-667.
94. Hut, K.M., Hurbert, R.E. (1979) Modificable chromatophore proteins in photosynthetic bacteria. J. Bacteriol. 138: 207-221.
95. Stephens, J.C., Artz, S.W. and Ames, B.N. (1975) Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): Positive effector for histidina operon transcription and general signal for amino acid deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 4383.
96. Pastan, I. and Adhya, S. (1976) Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *E. coli*. Bacteriol. Rev. 40: 527-551.
97. Raetz, C.R.H. (1978) Enzymology, genetics and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews. 42: 614-659.
98. McClure, W.R., Hawley, D.K. and Malan, T.P. (1982) The mechanism of RNA polymerase activation on the λ PRM and lacP⁺ promoters in promoters structure and function by Raymond L. Rodriguez and Michael J. Chamberlin. PRAEGER: 111-121 p.p.

PLASMIDOS UTILIZADOS EN EL TRABAJO



IX. APENDICE 2

Abreviaturas

Tc = Tetraciclina

Novo = Novobiocina

Minoc = Minociclina

Chelo = Chelocardina

pb = pares de bases

Kd = kilodaltons

g . = gramos

µg = microgramos

ml = mililitro

µl = microlitro

Ap = Ampicilina

Km = Kanamicina

Cm = Cloranfenicol

Hg = Mercurio

Sp = Espectinomicina

Su = Sulfadiacina

Nm = Neomicina

rpm = Revoluciones por minuto

DO = Densidad óptica

nm = nanómetros