

03062
lej. 3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

ESTABILIDAD DE PLASMIDOS TIPO COL E1 EN Escherichia coli K-12

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

presenta

JESUS AYALA SANMARTIN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pág.
I INTRODUCCION	1
1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ESTABILIDAD DE LOS PLASMIDOS	2
a) Regulación de la replicación	2
b) Mecanismos de estabilización	5
c) Información genética del huésped	8
2. HIPOTESIS	9
3. SUPOSICIONES	9
II OBJETIVO	11
III MATERIAL Y METODOS	13
1. CEPAS Y PLASMIDOS	13
2. TRANSFORMACION	13
3. ESTABILIDAD DE LOS PLASMIDOS	14
4. DISTRIBUCION DE RESISTENCIA A AMPICILINA	14
5. PURIFICACION DE PLASMIDOS	14
6. LISADOS CLAROS	15
7. SEPARACION DE LAS CELULAS EN GRADIENTES DE SACAROSA	15
8. DIGESTION DE NUCLEASAS Y LIGADO DE FRAGMENTOS DE DNA	16
9. ELECTROFORESIS EN GEL	16
a) Electroforésis en gel de agarosa	16
b) Minigeles	16
c) Electroforésis en gel de poliacrilamida	16

	Pág.
10. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE ELECTROFORESIS	17
11. DENSITOMETRIA	17
12. MARCAJE DE DNA CON ³ H-TIMIDINA Y SEPARACION EN GRADIENTES DE CLORURO DE CESIO	18
13. MICROSCOPIA ELECTRONICA	18
IV RESULTADOS	19
1. CONSTRUCCION Y PLASMIDOS	19
2. NUMERO DE COPIAS	23
a) Relación plásmido-cromosoma	23
b) Número de copias relativo	27
3. DISTRIBUCION DE RESISTENCIA A AMPICILINA	27
a) Distribución relacionada con el número de copias promedio	27
b) Distribución de la resistencia a ampicilina en las células cercanas a la división	32
4. GRADO DE MULTIMERIZACION	34
5. DISTRIBUCION DE UNIDADES A REPARTIR	37
6. TIEMPOS DE GENERACION	40
7. CINETICAS DE PERDIDA DE LOS PLASMIDOS	41
V DISCUSION	43
VI APENDICE	51
1. MODELO MATEMATICO	51
2. SIMULACIONES	52
VII REFERENCIAS	56

INTRODUCCION

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosomal que se replican autónomamente. Estas moléculas pueden ser de diversos tamaños, -- desde 4000 hasta alrededor de 150 000 pares de bases. Cada tipo de plásmido se encuentra en un número característico de copias por célula.

La estabilidad está dentro de los fenómenos fisiológicos y moleculares que involucran a los plásmidos. Hay dos significados diferentes para el concepto de estabilidad. Uno es el de estabilidad estructural. En este, la estructura del plásmido puede determinar rearrreglos moleculares diferentes. Por ejemplo, las secuencias repetidas invertidas presentes en un plásmido pueden recombinar y generar inversiones, -- mientras que las secuencias repetidas directas pueden inducir deleciones. Otros eventos como la transposición y recombinación con otros plásmidos pueden producir rearrreglos en la molécula. Un plásmido que sufre este tipo de rearrreglos se consideraría inestable.

El segundo significado de estabilidad implica el mantenimiento del plásmido en la población celular en el transcurso de las generaciones. Si en una población, en donde originalmente todas las células -

contenían plásmido, aparecen algunas que lo han perdido, se dice que el plásmido es inestable. Este trabajo trata de la estabilidad en esta segunda definición.

1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ESTABILIDAD DE LOS PLASMIDOS

a) Regulación de la replicación.

Para que un plásmido sea estable, se requiere que se replique eficientemente en cada ciclo celular, de manera que cada célula hija herede un número adecuado de copias. Por lo tanto, la regulación de la replicación tiene gran influencia en la estabilidad. Este mecanismo de regulación determina el número de copias del plásmido por célula.

Se han propuesto dos modelos principales para explicar la regulación de la replicación de los plásmidos. El modelo de Jacob y col. (1963), propone un control positivo con dos determinantes específicos: Un gene estructural que codifica para una molécula que actúa como iniciador de la replicación y un sitio operador de la replicación sobre el que actúa el iniciador. En un cierto momento, el iniciador que estaría unido a membrana, activa la replicación del plásmido generándose dos moléculas de plásmido unidas a la membrana. Los sitios de unión a membrana se alejan progresivamente durante el crecimiento, lo que asegura la equipartición de las moléculas al dividirse la célula, posteriormente se vuelve a dar la señal de iniciación.

Pritchard (1969) y Pritchard y col. (1969) proponen un mecanismo donde se asegura que un evento de iniciación es seguido por otro, sólo cuando el volumen celular se ha duplicado. Para ello, se propone un sistema de regulación negativa con dos determinantes: Un iniciador - que se sintetiza constitutivamente y que se encuentra en una concentración celular constante, y un inhibidor de la iniciación que se transcribe sólo durante un periodo corto inmediatamente después del inicio de la replicación. El inhibidor reprime en este momento la replicación, pero al aumentar la masa celular, se diluye y se produce la transición del estado de inhibición a inicio de replicación.

Nordström (1983) revisó y actualizó los modelos de replicación de los plásmidos. Este autor propone que el control de replicación incluya al menos una molécula inhibidora (proteína o RNA) codificada por el plásmido. Esta molécula se expresa constitutivamente en proporción a la dosis génica. El sitio blanco del inhibidor no es el sitio del origen de la replicación (Danbara y col. 1981).

Uno de los sistemas de regulación mejor comprendidos y que se adecúa al modelo de Pritchard, es el de los plásmidos tipo ColE1. En estos plásmidos, la molécula de RNA que sirve de primero de la replicación se transcribe a partir de un promotor que se encuentra entre -550 y -590 pares de bases del origen de replicación. La transcripción de este RNA o RNA II puede terminar en varios sitios después del origen, formando un RNA pre-iniciador que es procesado por la RNasa H para formar un iniciador funcional de 555 bases (Itoh y Tomizawa 1980). Se ha observado que transcritos provenientes de promotores lejanos pueden invadir la región de replicación y podrían funcionar como iniciadores.

En la región de -410 a -450 existe un promotor orientado en la dirección contraria al del pre-prímero. A partir de ahí se transcribe -- una molécula pequeña de RNA (RNAI) de aproximadamente 100 nucleótidos complementario al extremo 5' terminal del prímero. Este RNAI al interaccio--nar con el RNAII impide que este último actúe como iniciador (Tomizawa y col. 1981). La secuencia de bases del RNAI da posibilidades de formar --estructuras secundarias ya que tiene secuencias invertidas repetidas que le dan la capacidad de formar tres estructuras de tallo y asa (Morita y -Oka 1979). Es claro que las regiones con posibilidad de formar asa son --muy importantes para la interacción inhibitoria del RNAI, aunque la es--tructura tridimensional en que este RNAI funciona in vivo, está en discu--sión (Davison 1984 y Tomizawa 1984, 1985). Existe una proteína Rom de 63 aminoácidos codificada por el gene rop (Cesareni y col. 1982; Lacatena y col. 1984). Esta proteína participa en la regulación aumentando la efi--ciencia de la interacción del híbrido RNAI iniciador y (Tomizawa y Som --1984). Aparentemente, Rom sólo juega un papel potenciador, ya que si no existe el RNAI pierde su función represora.

En resumen, el mecanismo de la regulación de la replicación --del plásmido ColeI involucra la transcripción constitutiva de un RNA pre--prímero que es procesado por la RNasa H para formar al iniciador o RNAII. La función de este RNAII depende de la concentración de dos moléculas in--hedoras: El RNAI y la proteína Rom. El RNAI interacciona con el RNAII impidiendo que funciones como iniciador, mientras que la proteína Rom au--menta la eficiencia de la interacción RNAI - RNAII. La concentración de de RNAI es el factor más importante en la regulación del número de copias por célula.

Otro fenómeno en el que interviene el RNAI es en el de incompatibilidad. Cuando dos plásmidos no pueden coexistir establemente en una bacteria se dice que son incompatibles; esto se ha explicado como un fenómeno de competencia por la maquinaria de replicación. En el caso de los plásmidos tipo ColE1, las mutaciones que alteran la secuencia de bases en las asas del RNAI modifican la incompatibilidad. Davison (1984) propone un modelo en el que un dímero del RNAI es el inhibidor funcional, y una de las asas es fundamental para la represión. Los cambios en las asas aumentan o disminuyen la eficiencia del represor. Así, dos plásmidos diferentes compiten por los represores y uno de ellos, el que es reprimido con mayor eficiencia, se replica menos que el otro y es desplazado en la población.

b) Mecanismos de estabilización.

Se han encontrado genes que determinan o influyen en la estabilidad de distintos plásmidos por tres mecanismos diferentes. El primero es un mecanismo de segregación análogo al proporcionado por los centrómeros en las células eucariontes. Al replicarse un plásmido, las dos copias resultantes se unían a estructuras de membrana para formar el aparato de partición o "partisoma", que separaría las copias del plásmido una a cada célula hija (modelo de Jacob (1963)).

Uno de los casos mejor conocidos es el de el plásmido F (Ogura e Hiraga 1983a), que posee tres genes involucrados en este mecanismo: sopA sopB y sopC. Los dos primeros codifican para proteínas de 41 y 37kd respectivamente (Wehlmann y Eichenlaub 1980 y Komai y col. 1982) y sopC que es un sitio que se requiere en cis. El gene sopC sería reconocido --

por las proteínas SopA y SopB, y junto con proteínas del huésped formarían el aparato de partición. Se han hecho experimentos que sugieren este tipo de sistema para otros plásmidos: El DNA del fago P1 que al lisogenizar pasa a un estado circular citoplásmico similar a un plásmido, tiene un sistema de estabilidad muy parecido al F. El fago P1 tiene dos genes (para y parB) que codifican para proteínas de 42-44 kd y 34 kd respectivamente, y un sitio en cis (Austin y Abeles 1983a y 1983b). El plásmido -- pSC101 posee un gene par que es necesario en cis para su estabilidad, y -- que además puede estabilizar plásmidos no relacionados (Meacock y Cohen -- 1980). La región par tiene tres secuencias repetidas, dos directas y la central invertida (Miller y col. 1983). Diferentes deleciones en esta -- región dan diferentes grados de estabilidad (Tucker y col. 1984). Se ha propuesto que esta región del plásmido se une a membrana externa (-- Gustafsson y col. 1983). El plásmido R1 tiene dos loci de estabilidad, para y parB necesarios en cis (Gerdes y col. 1985) y que posiblemente -- funcionen como sitios de anclaje a membrana.

Un segundo mecanismo para la estabilidad de los plásmidos es el de recombinación sitio especifica que asegura la existencia de suficientes unidades a repartir monomerizando las moléculas multiméricas. -- Estas formas multiméricas se pueden formar por los sistemas de recombinación interplasmídica de la bacteria, o al término del ciclo de replicación del plásmido.

El fago P1 posee un sistema de recombinación con dos genes: loxP y cre (Austin y col. 1981). El gene loxP es el sitio en cis de recombinación; este sitio está compuesto por no más de 60 pares de bases y -- contiene dos secuencias invertidas repetidas de 13 pares de bases, con -

un espaciador de 8 que aparentemente es el punto de recombinación (Hoess y col. 1982). El gene cre es funcional en trans y codifica para la recombinasa. El plásmido Cl⁶DF13 posee un gene parB que, al ser deletado en las mutantes cop3 (mutantes con mayor número de copias), las vuelve inestables y les aumenta el grado de multimerización (Hakkaart y col. - 1982 y 1984). Esta región produce la monomerización de estos plásmidos por recombinación sitio específica, y al igual que loxP, es capaz de formar estructuras secundarias que aparentemente requieren de transcripción para que se exprese su función (Van den Elzen y col. 1983).

El plásmido ColEI tiene un gene cer funcional en cis con propiedades de recombinación similares a loxP y parB (Summers y Sherratt 1984). Cuando se deleta cer, el plásmido se vuelve inestable, pero puede reestabilizarse con el sistema de resolución de Tn₃. Se desconoce -- cual es la enzima responsable de la recombinación sitio específica de -- cer, pero podría estar codificada en el cromosoma y/o en el mismo plásmido.

Un tercer mecanismo es la inhibición de la división celular - cuando no existe un número de copias que asegure la segregación equitativa.

Un sistema de este tipo se encuentra en el plásmido F. En este plásmido, el gene ccdB codifica para un inhibidor de la división celular y el gene ccdA para un represor de ese inhibidor (Ogura e Hiraaga -- 1983b), de manera que la concentración relativa de los productos de estos dos genes contribuye a regular la división celular en relación al número

de copias del plásmido presente en células próximas a dividirse. Hay dos fases de lectura en esta región, que podrían codificar para proteínas de 8 y 11 kd (Miki y col. 1984).

c) Información genética del huésped.

Además de la información codificada por el plásmido, existe in formación cromosomal que influye en la estabilidad de los plásmidos. En la bacteria mutante hop18 los plásmidos mini-F estables (Sop⁺) son inestables. Esta mutante podría ser defectiva en una función esencial para la participación del mini-F. Se han reportado otras mutantes que también -- afectan, en diferente grado, la estabilidad de los plásmidos. Es posible que estas mutantes sean parcialmente defectivas para la replicación del -- mini-F (Hiraga y col. 1985).

Otro tipo de información importante en estabilidad involucra -- los sistemas de recombinación. Como se dijo, el equilibrio entre las diferentes formas multiméricas interviene en estabilidad, y los sistemas de recombinación inter e intraplasmídica, pueden ser de importancia en el -- fenómeno. Activando el sistema de recombinación recE, los plásmidos -- par⁻ derivados del CloDF13, se mantienen establemente como monómeros ya que en este caso el sistema de recombinación recE suple al del plásmido -- (Hakkaart y col. 1982). Células recA⁻ y recBC⁻ sbcB⁻ producen la monome- rización y estabilidad del pBR322 mientras que en las mutantes recBC⁻ -- sbcB⁻ recF144, el plásmido es inestable y se encuentra en forma multiplásmídica (Krivonogov 1984).

2. HIPOTESIS

Tomando los datos de los ejemplos anteriores, podemos plantear dos estrategias principales de estabilización. La primera operaría en el caso de plásmidos de bajo número de copias, requeriría de la presencia de sistemas de partición con una función análoga a la del centrómero de las células eucariontes y de la recombinación de las moléculas para producir monómeros para la segregación. La segunda operaría para plásmidos multicopia. En este caso, sólo el número tan alto de copias asegura que en el momento de la división celular, las células hijas queden con al menos una copia del plásmido, sin intervención de ningún otro mecanismo que no sea el azar. En este último caso, proponemos que hay un solo parámetro importante que determina el grado de estabilidad del plásmido: la distribución de unidades físicas a repartir en la población de células próximas a dividirse.

3. SUPOSICIONES

Existen algunas suposiciones que hay que tomar en cuenta si se quiere explicar la estabilidad por la hipótesis de partición al azar.

- i) La distribución de células con un diferente número de unidades a repartir en poblaciones creciendo sin presión selectiva se mantiene constante (Distribución al equilibrio).
- ii) Cada subpoblación tiene una probabilidad diferente de generar células sin plásmido.

- iii) La frecuencia de producción de células sin plásmido en una generación es constante una vez que la poblaciones llega a su distribución al equilibrio.
- iv) No importa cuál sea la presión selectiva sobre la población inicial; cuando ésta desaparece, la población tiende a alcanzar su distribución al equilibrio.
- v) Un tiempo de generación mayor o menor de la subpoblación de células con plásmido con respecto a la que no lo posee modifica la cinética de pérdida.

II

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar si efectivamente la estabilidad de los plásmidos multicopia se debe a la distribución de células con diferente número de unidades a repartir.

En función de las suposiciones anteriores podemos hacer una serie de predicciones sobre el fenómeno:

i) Una población bacteriana con un plásmido estable debe tener una distribución de unidades a repartir tal, que no existan subpoblaciones con número muy bajo de las mismas (la probabilidad de pérdida del plásmido en la división de una célula con 6 unidades es de 0.03). Para que no existan dichas subpoblaciones ; el plásmido debe tener una regulación de la replicación precisa y un sistema de monomerización eficiente.

ii) Una población bacteriana con plásmido inestable debe poseer subpoblaciones con bajo número de unidades a repartir (probabilidad de pérdida de 0.5 para división de una célula con dos unidades). Esto podría deberse a un sistema de monomerización deficiente y/o a una regula-

ción poco precisa.

Sistema experimental

Tomando en cuenta lo arriba mencionado, es ideal un sistema experimental con plásmidos con diferentes distribuciones de unidades a repartir. Esto se puede lograr con plásmidos con diferencias en los represores de la replicación como la proteína Rom y el RNAI, produciendo plásmidos -- con diverso número de copias, y con plásmidos con distinta eficiencia de monomerización.

Los plásmidos tipo ColE1 presentan diversidad en estas características, por lo que son un modelo adecuado para este tipo de experimentos.

III

MATERIAL Y METODOS

1. CEPAS Y PLASMIDOS

En este trabajo se utilizaron dos cepas de E. coliK12: C600 -- (F⁻, thr⁻ leu⁻ thi⁻ Lac⁻) y GM31 (F⁻ galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyi-5 thr-1 leu-6 thi-1 tonA31 str-136 his-4 tsx-78 mtl-1 dcm-6 supE44).

Los plásmidos utilizados fueron: pBR322, Bolivar y col. -- (1966b); pBR327, Soberón y col. (1980); pBR329, Covarrubias y Bolívar -- (1982); ColE1, Bazaral y Helinski (1968); pDS1109, Dougan y Sherratt -- (1977); y pI01 y pT7 construidos en este trabajo.

2. TRANSFORMACION

Se crecieron células en medio Luria a 37°C hasta una densidad óptica de 0.4 (550 nm), y se transformaron siguiendo el protocolo de -- Cohen y col. (1972), con la modificación de que las soluciones de CaCl₂ y NaCl tenían MgCl₂ a una concentración 5mM.

3. ESTABILIDAD DE LOS PLASMIDOS

Las células se crecieron en matraces nefelométricos de 125 cm^3 , con 10 cm^3 de medio Luria en un baño a 37°C y con agitación de 210 rpm. - Se hicieron diluciones cuando el cultivo estaba en 0.4 de densidad óptica a 550 nm. En cada dilución se tomaron alícuotas para hacer un rastreo de cuentas viables en cajas de Petri con Luria Sólido y se parcharon 100 colonias en cajas de Luria con ampicilina 0.2 mg cm^{-3} para determinar el porcentaje de células resistentes.

4. DISTRIBUCION DE RESISTENCIA A AMPICILINA

Las células provenientes de las condiciones experimentales de estabilidad (número 3 de esta sección) o de gradientes de sacarosa (número 7 de esta sección), se diluyeron y se sembraron por espatulado en cajas de Petri con Luria a diferentes concentraciones de ampicilina, desde 0.1 hasta 9 mg cm^{-3} en algunos casos. Las cajas se prepararon 12 horas antes del experimento y se preincubaron a 37°C .

5. PURIFICACION DE PLASMIDOS

La purificación de los plásmidos se hizo como describen Bolívar y col. (1977a): lisis alcalina con SDS, cromatografía en Biogel A-50 y centrifugación en gradientes de CsCl con yoduro de propidio.

La amplificación de los plásmidos con el gene de resistencia a cloramfenicol se hizo con $300 \mu\text{g cm}^{-3}$ de espectinomicina.

6. LISADOS CLAROS

Para obtener lisados claros de las cepas con los plásmidos, se utilizó el método de lisis alcalina con SDS (Maniatis y col. 1982). Este método se adaptó en nuestro laboratorio para volúmenes de 20 cm³ de cultivo con 0.5 unidades de densidad óptica a 550 nm, precipitando con etanol 20 minutos a -20°C y utilizando la centrifuga Sorvall RC-5B.

7. SEPARACION DE LAS CELULAS EN GRADIENTES DE SACAROSA

Se cultivaron 7.5 cm³ de Luria con la cepa que se requería en las condiciones experimentales de estabilidad hasta una densidad óptica de 0.45, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se resuspendieron en 0.3 cm³ de amortiguador BSG estéril a 4°C (NaCl 0.85% KH₂PO₄ 0.03% Na₂HPO₄ 0.06% y gelatina 0.001%) y se colocaron sobre un gradiente lineal de sacarosa preparado en tubos corex de 15 cm³. El gradiente se preparó por congelamiento y descongelamiento de una solución de sacarosa al 30% (Sacarosa 30%, NaCl 0.1 M, EDTA 0.005 M y Tris 0.01 M pH 7.5). La solución se congela a -20°C y se descongela a 4°C 5 horas antes de la centrifugación. Se centrifugó el gradiente en el rotor HB4 a 4 000 rpm -- por 7 minutos en la Sorvall RC-5B. Se colectó el tercio inferior y se repitió el procedimiento por segunda vez. Se tomaron las células correspondientes a la mitad inferior del segundo gradiente, se diluyeron y sembraron en cajas de Luria con ampicilina a diferentes concentraciones para el ensayo de distribución de resistencias.

8. DIGESTION CON NUCLEASAS Y LIGADO DE FRAGMENTOS DE DNA

Las enzimas utilizadas en este trabajo fueron: DNasaI, EcoRI, PstI, EcoRII, BamHI, AvaI y ligasa de T4. Las reacciones con estas enzimas se hicieron de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

9. ELECTROFORESIS EN GEL

a) Electroforesis en gel de agarosa.

Para la separación de plásmidos o fragmentos de DNA se prepararon geles de agarosa al 0.8% en placas (13 x 11 x 0.15 cm), los geles se sometieron a electroforesis vertical en amortiguador BA (Tris 0.05 M, -- EDTA 2 mM, NaCl 0.018 M pH 8.1). Las electroforesis para las determinaciones del grado de multimerización se corrieron a 60 V y para los experimentos de número de copias relativo y separación de fragmentos de DNA a 80 V.

b) Minigeles

Sobre vidrios de 7.5 x 5 cm se colocan 10 cm³ de agarosa 1%. Se corren horizontalmente a 80 V en amortiguador BBO (Tris 0.09 M, Na₂EDTA 2.5 mM y H₃BO₃ 0.09 M pH 8.2) de 30 a 40 minutos.

c) Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para separar fragmentos de DNA se prepararon placas (12 x 11 x 0.15 cm) con geles de poliacrilamida (T = 7.5%, C = 2.66%) en amortiguador BBO y se corrieron a 80 V.

d) Electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión.

Se usaron las mismas condiciones que en la electroforesis en -- agarosa solo que con agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad). La elec-- troforesis se corrió a 4°C.

10. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE ELECTROFORESIS

Después de electroforesis se tiñó el gel con bromuro de etidio ($10 \mu\text{g cm}^{-3}$), se visualizó el DNA con luz ultravioleta y se cortaron las - bandas deseadas. Los fragmentos de agarosa con el DNA se colocaron en las cámaras de electroelución en el compartimento correspondiente al polo nega-- tivo con amortiguador TE (Trizma-base 10 mM y Na_2EDTA 1 mM pH 8). Las cu-- bas se llenaron con amortiguador TEA (Trizma-base 0.2 M, Acetato de sodio 0.06 M y Na_2EDTA 9 mM pH 8.1). Se aplicaron 100 V por 1.5 horas. Se in-- virtieron los electrodos por 3 minutos. Se tomó el amortiguador de la cá-- mara correspondiente al polo positivo y se repitió la operación para aumen-- tar el rendimiento. El amortiguador con el DNA se extrajo con un volumen de fenol-cloroformo y la fase acuosa se precipitó con 2.5 volúmenes de eta-- nol y se incubó a -20°C por 12 horas. Otro sistema usado para recuperar - DNA de geles fue el método de Wieslander (1979), a partir de geles de aga-- rosa de bajo punto de fusión. Se cortaron las bandas deseadas, se recupe-- raron fundiendo la agarosa a 65°C, se extrajo con fenol-cloroformo y se -- precipitó con etanol como se describió anteriormente.

11. DENSITOMETRIA

Los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio siguiendo -- las recomendaciones de Rojan y col. (1983), se fotografiaron con negativos

Kodak royal pancromática 4141 con tiempos de exposición de 2.5, 3 y 3.5 minutos, los negativos se sometieron a densitometrías a 600 nm en el espectrofotómetro Gilford 250.

12. MARCAJE DE DNA CON ^3H -TIMIDINA Y SEPARACION EN GRADIENTES DE CLORURO DE CESIO

Antes de la lisis se incubaron 5 cm^3 de Luria en condiciones experimentales de estabilidad, hasta una densidad óptica de 0.6 a 550 nm. Aproximadamente 5 a 6 generaciones antes se añadió al medio 20 mm^3 de metil- ^3H -timidina (New England Nuclear 1 mCi cm^3 con $71.7\text{ Ci m mol}^{-1}$). El lisado y el gradiente de cloruro de cesio se hicieron de acuerdo a las especificaciones de Womble y col. (1977). El gradiente se fraccionó con bomba peristáltica y las fracciones se colectaron sobre filtros. Los filtros se procesaron de la siguiente manera: TCA 10% por 20 minutos; TCA 5% por 20 minutos (dos veces); Etanol 90% 20 minutos (dos veces). Se dejaron secar y se colocaron en viales con mezcla de centelleo (PPO 0.8% y POPOP 0.01% en tolueno) y se contaron en contador de centelleo líquido.

13. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Siguiendo el protocolo de Davis y col. (1971), se prepararon rejillas para microscopía con DNA purificado de bacterias creciendo en las condiciones experimentales de estabilidad. Se observaron a 8 y 30 mil aumentos en el microscopio electrónico Jeol 100.

IV

RESULTADOS

1. CONSTRUCCION Y PLASMIDOS

Con el objeto de obtener plásmidos con diferentes distribuciones de unidades a repartir, se eligieron tres plásmidos tipo ColE1 que tienen diferente número de copias: pBR322, pBR327 y pBR329. El plásmido pBR322 tiene reportadas alrededor de 60 copias por célula y el pBR327 tres veces más. Por otro lado, el pBR322 tiene el gene rop funcional, mientras que a los otros dos plásmidos se les deletó parte de esa región (Fig. 1). Por otro lado, el pBR329 tiene un gene que codifica para la enzima cloramfenicol acetil transferasa. La inserción de este gene separó al promotor anti-tet del promotor del gene bla, mientras que en el pBR327 y pBR322 estos dos promotores están próximos.

Estos plásmidos contienen el gene bla que codifica para la enzima β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina. La presencia de este gene permite determinar el número de copias del plásmido por célula y su distribución en la población bacteriana, ya que el nivel de resistencia celular al antibiótico es proporcional al número de genes bla (Uhlín y Nordström 1977). Debido a la inserción del gene de la cloramfenicol acetil

transferasa en el pBR329, es posible que bla se transcriba con una eficiencia diferente a la de los genes bla de los plásmidos pBR322 y pBR327, y - por lo tanto, determine un nivel de resistencia a ampicilina por copia -- distinto.

CONSTRUCCION pIO1

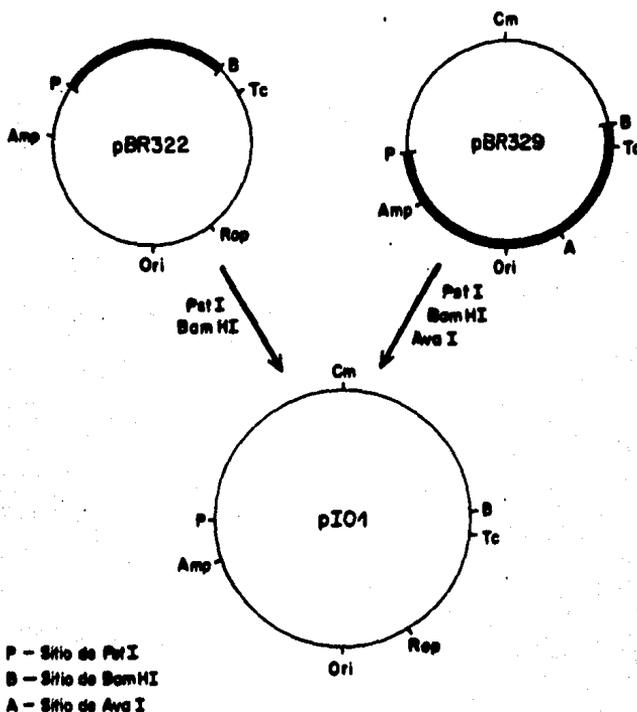


Figura 1. Construcción del plásmido pIO1. Amp; gene de resistencia a ampicilina. Tc; gene de resistencia a tetraciclina. Ori; origen de replicación. Rep; gene del repressor Rom.

Con el objeto de obtener un plásmido con las características de replicación y número de copias del pBR322 y la misma transcripción del gene bla que el pBR329, se construyó el plásmido pI01 (Fig. 1). Para esto se cortaron los plásmidos pBR322 y pBR329 con PstI y BamHI. El corte con AvaI del pBR329 se hizo con el objeto de cortar la banda con el origen de replicación y separar mejor en un gel de agarosa la banda con el gene de resistencia a cloramfenicol. En la Figura 2 se muestran algunas digestiones que comprueban el patrón esperado para el pI01. La segunda banda de la digestión con EcoRII del pBR322 tiene parte del origen de replicación y se encuentra en el pI01 más no en el pBR329. La tercera banda que aparece en la digestión con EcoRII del pBR329 contiene parte del gene de la cloramfenicol acetil transferasa no aparece en el pBR322 y sí en el pI01.

El plásmido estable elegido como control fué el ColeI por su gran homología con la región de replicación del pBR322. El plásmido -- ColeI carece del gene bla por lo que no es posible calcular su número de copias por célula y su distribución utilizando el fenotipo de resistencia a ampicilina. Por otra parte, no es posible estudiar fácilmente su estabilidad, pues contiene un gene para la producción de colicina El y otro -- que confiere inmunidad a esta colicina, por lo que en una población bacteriana, la célula que pierde al plásmido es seleccionada negativamente. -- Sin embargo, existen derivados de este plásmido como el pDS1109, con inserciones de TnI en el gene de producción de colicina. Por un lado se -- inactiva el gene de colicina con lo que es posible estudiar estabilidad y por otro el TnI contiene al gene bla lo que permite calcular el número de copias por célula. Un problema que tienen estos derivados es que el gene

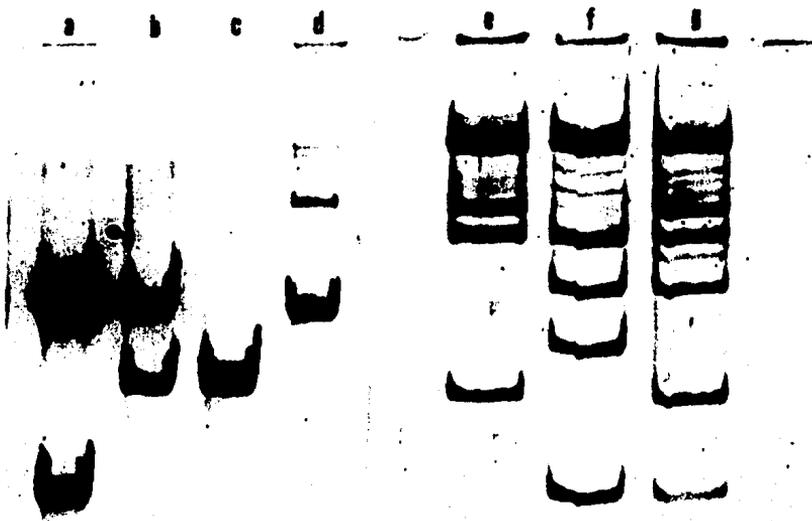


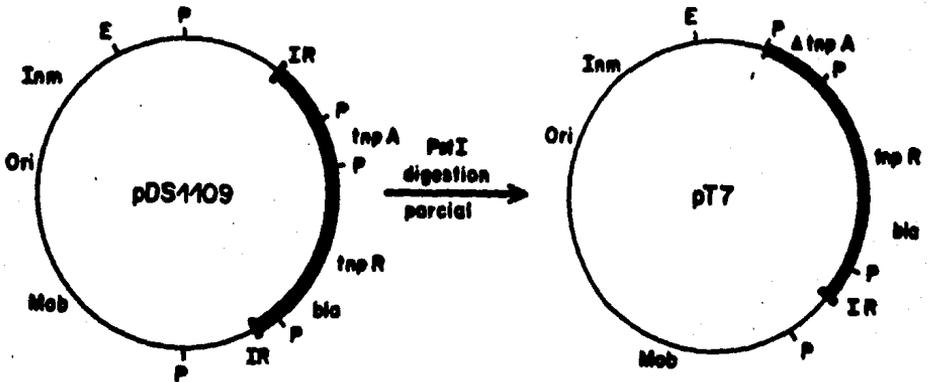
Figura 2. Caracterización del pI01 por patrones de restricción. a,e; pBR322. b,d,g; pI01. c,f; pBR329. a,b,c; digestión con PstI y BamHI. e,f,g; digestión con EcoRII.

bla está dentro de un transposón y puede movilizarse integrándose al cromosoma, esto proporcionaría un número de genes bla mayor que el número de -- copias del plásmido.

Con el fin de obtener el plásmido control con el gene de β -lactamasa inmóvil, se hizo una digestión parcial del pDS1109 para deletar parte de la transposasa y uno de los extremos necesarios para la transposición, dando como resultado el pT7 (Fig. 3). En la Figura 4 se muestra la

caracterización del pT7. La pérdida de la tercera banda confirma la iden tidad del plásmido.

CONSTRUCCION pT7



E- Sitio de EcoRI
P- Sitio de PstI

Figura 3. Construcción del plásmido pT7. Inm; inmunidad a colicina. Ori; origen de replicación. Mob; movilidad. IR; secuencia invertida repetida del Tnl. tnpA; transposasa. tnpR re-- presor-resolvasa. bla: β-lactamasa.

2. NUMERO DE COPIAS

a) Relación plásmido-cromosoma.

Para determinar el número de copias de plásmido por cromosoma, se marcó el DNA total con ³H-timidina y se separó en DNA circular cerrado

(plásmido) y DNA lineal (cromosoma) en un gradiente de cloruro de cesio - con yoduro de propidio. El cultivo se inició con células recién sacadas de presión selectiva (tetraciclina $25 \mu\text{g cm}^{-3}$) y la lisis celular se efectuó de 8 a 9 generaciones después. En la figura 5 se muestra uno de los gradientes.

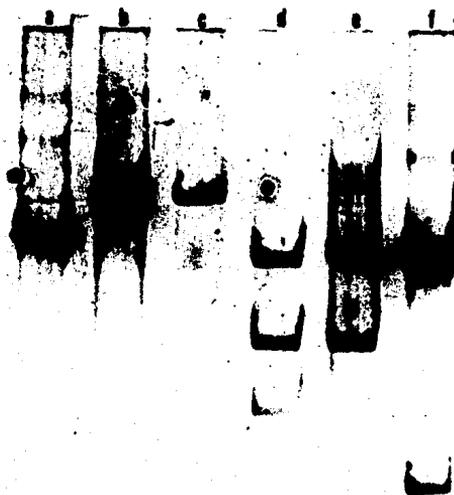


Figura 4. Caracterización del pT7. a,f; ColEI. b,e; pT7. c,d; pDS1109. a,b,c; digestión con EcoRI. d,e,f; digestión con PstI.

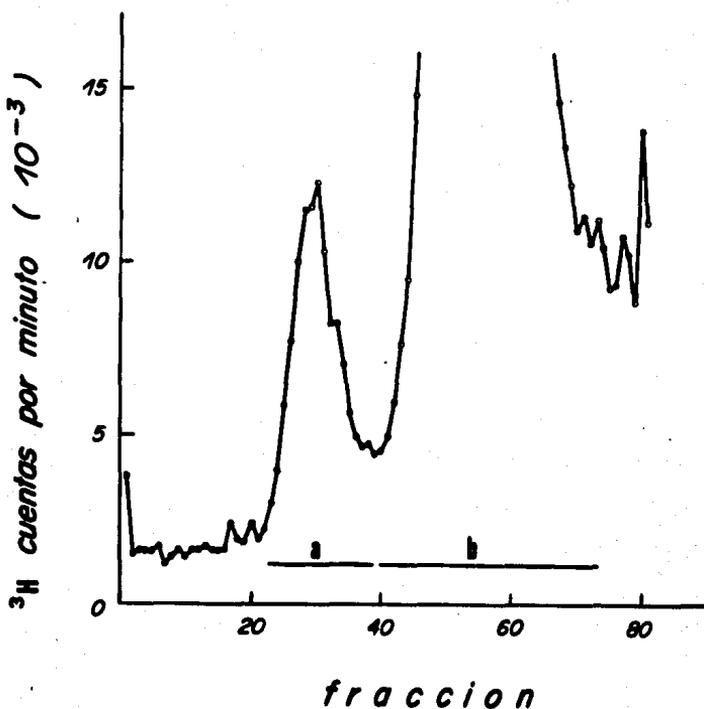


Figura 5. Gradiente de cloruro de cesio con yoduro de propidio de una extracción de DNA total de la cepa C600/pT7. (a) plásmido - (b) cromosoma.

El dato calculado del gradiente es el número de copias por cromosoma. Para convertir éste a número de copias por célula, se utilizó el criterio de que en promedio, el número de cromosomas de una población en crecimiento exponencial es de 1.5. Por este método, al ColE1 y al pT7 - se les encontró un número de copias muy semejante. De dos gradientes para el ColE1 se obtuvieron 11.5 ± 2.5 copias por célula, y de tres gradien

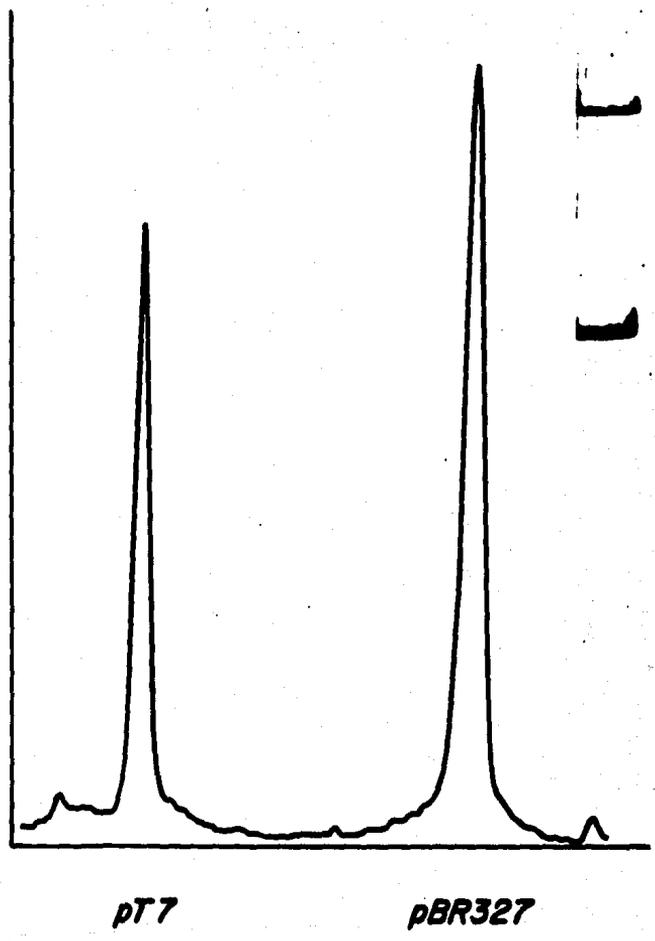


Figura 6. Densitometría de un gel de agarosa para pT7 y pBR327. En la parte superior derecha se muestra la foto del carril que se utilizó para esta densitometría.

tes para el pT7 11 ± 3.2 . Esta semejanza era de esperarse, pues ambos plásmidos tienen el mismo replicón.

b) Número de copias relativo.

Un segundo sistema para determinar el número de copias es hacerlo relativo a algún otro plásmido. El plásmido que utilizamos como control fue el pT7, debido a la correlación en el número de copias que se encontró con el ColEI medido por gradientes en cloruro de cesio. Se mezclaron volúmenes iguales de cultivo a la misma densidad óptica, uno de la cepa con pT7 y otro de la cepa con el plásmido a analizar. Se lisó la mezcla y el DNA se digirió con EcoRI para linearizar ambos plásmidos y se separó por electroforesis en un gel de agarosa (Fig. 6). Por otra parte se sembró una alícuota del cultivo para determinar el porcentaje de células con plásmido, para calcular de manera más precisa el número de copias por célula. El negativo de la fotografía de los gels se sometió a densitometría. Los resultados de densitometrías de dos a ocho negativos se muestran en la Tabla 1.

3. DISTRIBUCION DE RESISTENCIA A AMPICILINA

a) Distribución relacionada con el número de copias promedio.

Experimentalmente determinamos el porcentaje de células resistentes a diferentes concentraciones del antibiótico. Esto se grafica como una curva de frecuencia acumulada (Fig. 7) con la que se determina la distribución de resistencia a ampicilina. Esto último se hace tomando intervalos de resistencia a modo de clases y del intervalo de concentración más

Tabla 1. Número de copias promedio determinado por densitometría de geles de agarosa.

Plásmido	Número de copias relativo	Número de copias por célula*
pT7	1	11
pI01	3.34 \pm 0.17	37
pBR322	5.55 \pm 0.47	61
pBR327	6.76 \pm 2.93	74
pBR329	1.84 \pm 0.03	20

* Se tomó como referencia el número de copias del -- pT7 obtenido por gradientes de cloruro de cesio con yoduro de propidio.

alto hacia cero se resta el porcentaje de la clase inmediata anterior.

Con la distribución es posible calcular la resistencia promedio y hacer la relación con el número de copias promedio para establecer el nivel de resistencia por copia. Una de las suposiciones sobre la distribución de copias era que ésta llega a una situación de equilibrio. -- La Figura 8 es una demostración de que esto sucede.

La distribución de las células resistentes no cambia apreciablemente en los plásmidos pT7, pI01 y pBR329, al menos de la generación 50 a la 100. No se determinó esto para los plásmidos pBR322 y pBR327. En la Figura 7 se observa el porcentaje de células resistentes a diferentes concentraciones de ampicilina para tres plásmidos y en la Figura 9 -- las distribuciones que de ahí se derivan.

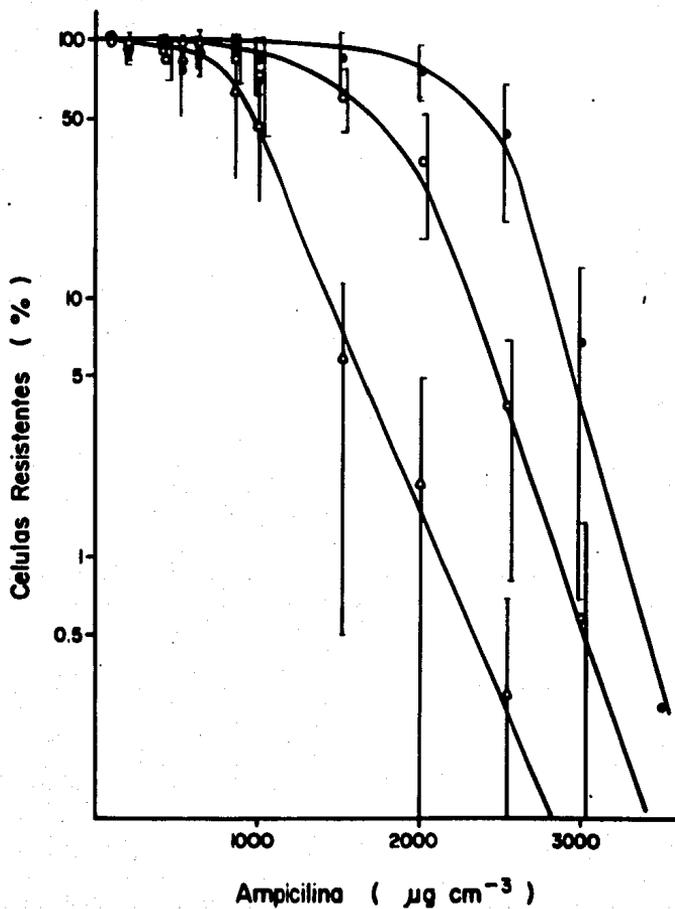


Figura 7. Curva de resistencia a ampicilina de células en equilibrio. (Δ) pBR329, (\square) pIO1 y (\circ) pT7.

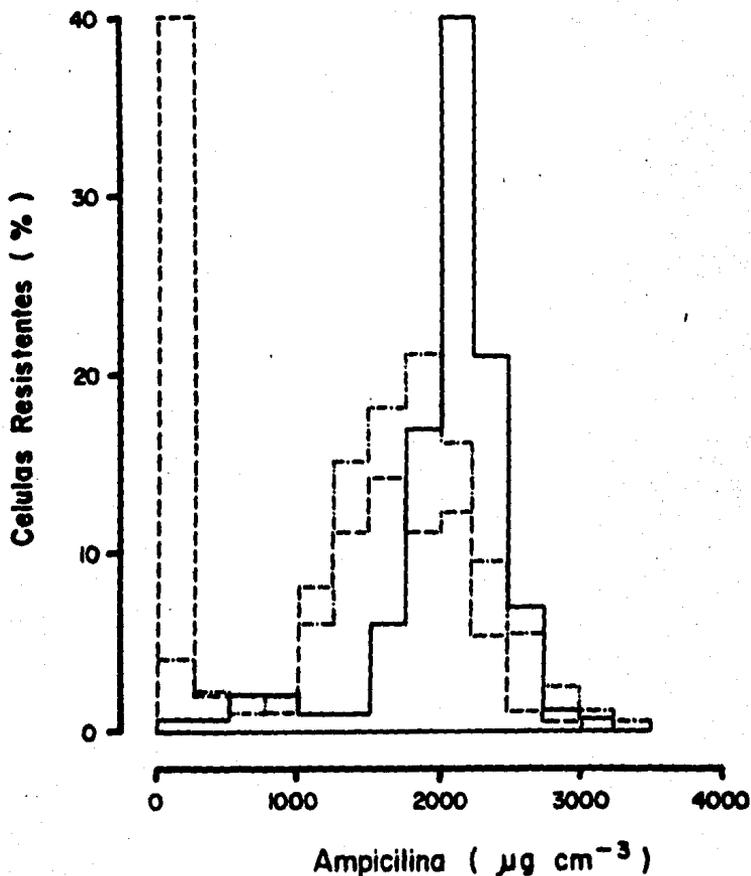


Figura 8. Distribución de niveles de resistencia a ampicilina del plásmido p101 a diferentes generaciones. (—) Generación cero, células en una presión selectiva de tetraciclina de $50 \mu\text{g cm}^{-3}$. (-.-.-) generación 53 sin presión selectiva en las condiciones de los experimentos de estabilidad. (---) generación 109 en las mismas condiciones que la generación 53.

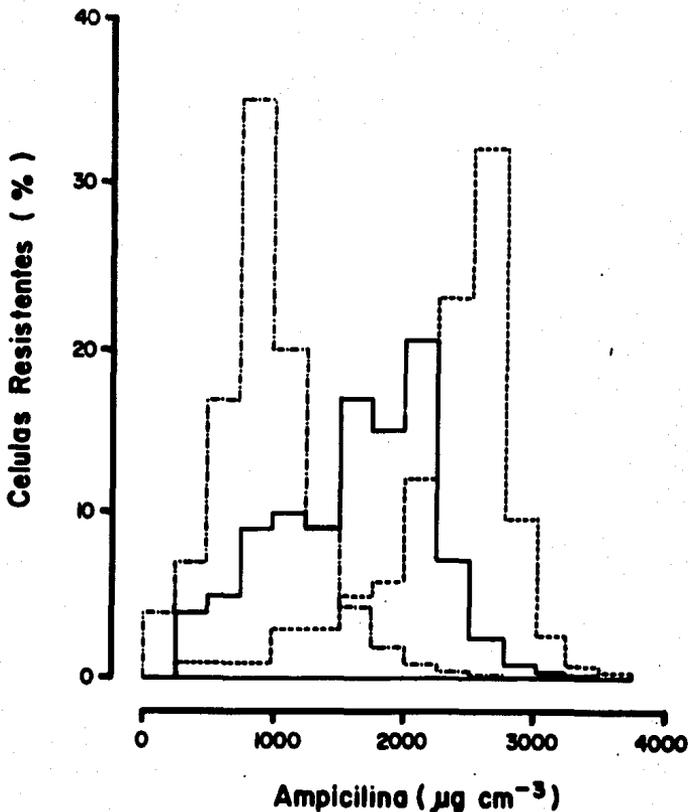


Figura 9. Distribución de resistencia a ampicilina de cepas en equilibrio (-----) pBR329, (—) pI01 y (-·-·-) pT7.

La Tabla 2 muestra la resistencia a ampicilina por copia del ga ne de β-lactamasa. Si se compara la resistencia del pT7 con la de los demás, resulta ser más alta, esto se podría deber a que el gene bla del pT7 viene del Tn1, mientras que el gene bla de los otros plásmidos proviene -

del Tn₃. Como se explicó en la construcción de los plásmidos, el pI01 y el pBR329 deben de tener un nivel de resistencia por copia igual, y así sucede. El pBR322 y el pBR327 dan mayor resistencia probablemente por el hecho de tener el promotor anti-tet más cercano al gene de β -lactamasa lo que produciría un mayor nivel de transcripción de ese gene.

Tabla 2. Resistencia a ampicilina por copia del gene de β -lactamasa (a).

Plásmido	Resistencia promedio a ampicilina (b) ($\mu\text{g cm}^2$)	Número de copias por célula (c)	Resistencia por copia ($\mu\text{g cm}^2 \text{ copia}^{-1}$)
pT7	2294	<u>11</u>	208
pI01	1616	37	44
pBR329	937	20	47
pBR322	7540	61	124
pBR327	6695	74	90

(a) En las condiciones de estabilidad en equilibrio.

(b) Promedio de histogramas como el de la Figura 9

(c) Tomado de la Tabla 1.

b) Distribución de la resistencia a ampicilina en las células cercanas a la división.

Las células que participan activamente en el fenómeno de estabilidad son aquellas que se están dividiendo y produciendo células sin plásmido, por lo tanto para caracterizar el fenómeno es necesario determinar la distribución de unidades a repartir de las células cercanas a la división. Para tal propósito se elaboraron curvas de resistencia a ampicilina de células grandes (cercanas a la división) separadas en gradientes de

sacarosa. Se tomó el valor de la Tabla 2 para determinar el intervalo de resistencia por copia y así sacar la distribución de copias que se muestra en la Figura 10. Debido al alto nivel de resistencia, el último valor de cada gráfica es acumulativo.

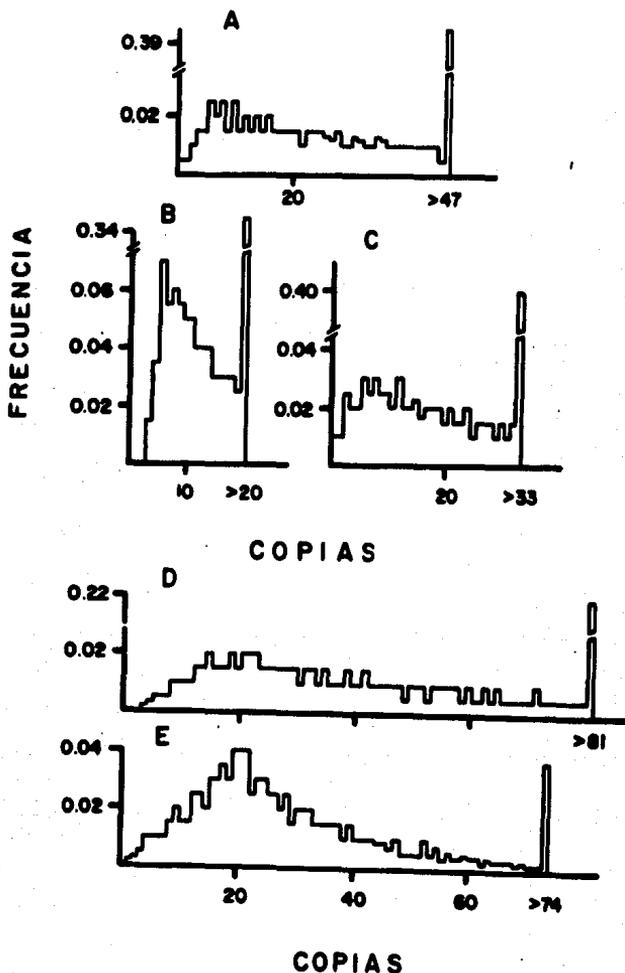


Figura 10. Distribución del número de copias de plásmido en células cer canas a división. A) pBR327; B) pT7; C) pBR322; D) pI01 y E) pBR329.

4. GRADO DE MULTIMERIZACION

De células creciendo en las condiciones de estabilidad, se hicieron tres extracciones de plásmido por el método de lisis alcalina. Se corrieron electroforesis en geles de agarosa y se hizo densitometría a tres negativos con 4 a 5 carriles con diferente cantidad de DNA (Figs. 11, 12 y 12), y se cuantificaron las diferentes especies moleculares. Para --

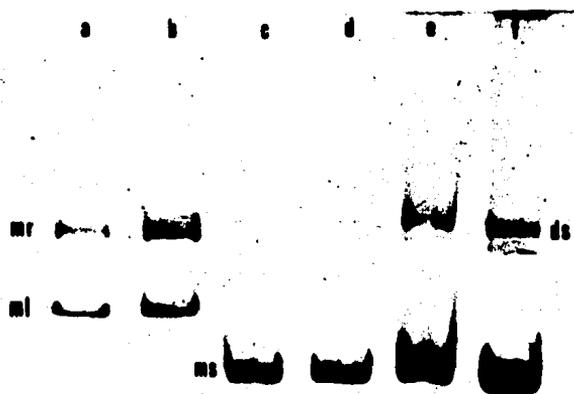


Figura 11. Especies moleculares del plásmido pT7 en electroforesis en geles de agarosa. a) y b) marcadores: a) digestión con EcoRI, b) digestión con DNaseI c-f) diferentes cantidades de DNA. ms-monómero superenrollado, ml-monómero lineal, mr-monómero relajado y ds-dímero superenrollado.

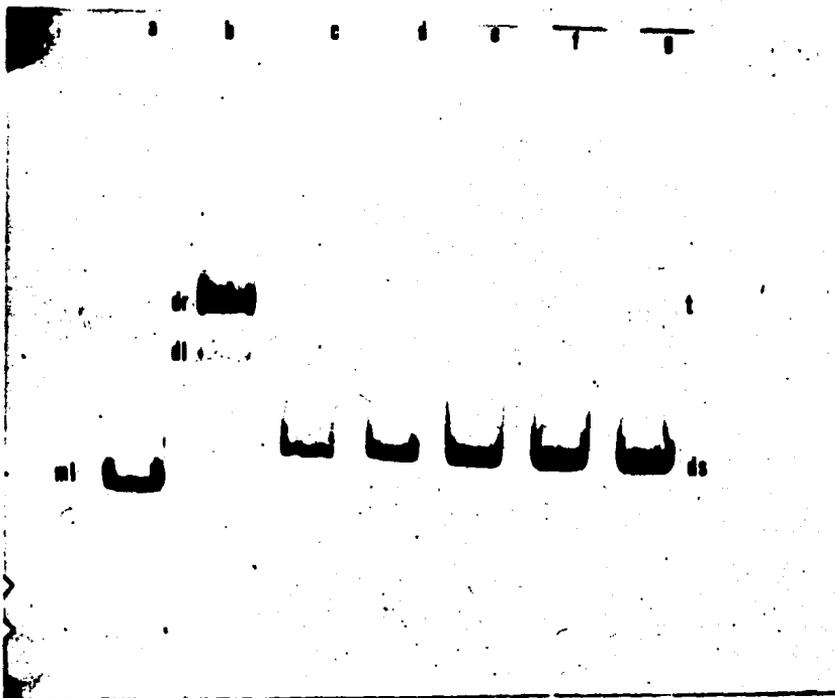


Figura 12. Especies moleculares del plásmido pBR327 separadas por electroforesis en geles de agarosa a y b marcadores: a) digestión con PstI, b) digestión con DNasaI, c-g) diferentes cantidades de DNA. a1-monómero lineal, d1-dímero superenrollado, e1-dímero lineal, f1-dímero relajado y g1-tetrámero.

identificar las diferentes especies moleculares se usaron como controles plásmido digerido con EcoRI o PstI para localizar el monómero lineal, y una muestra digerida brevemente con DNasaI para localizar a los monómeros y dímeros relajados. Los porcentajes de las diferentes especies se mues-

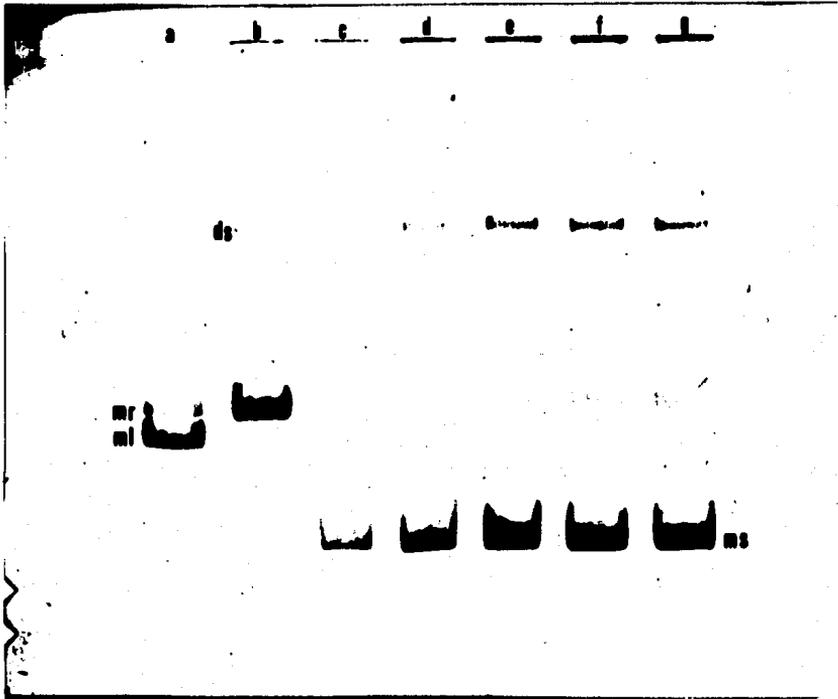


Figura 13. Especies moleculares del plásmido pBR329 separadas por electroforesis en geles de agarosa. a y b) marcadores: a) digestión con PstI, b) digestión con DNAseI, c-g) diferentes cantidades de DNA. ms-monómero superenrollado, ml-monómero lineal, mr-monómero relajado y ds-probable dímero superenrollado.

tran en la Tabla 3, ColE1 y pT7 tienen un grado de dimerización similar. El hecho de encontrar dímeros para ColE1 y pT7 era inesperado, pues ColE1 posee el sitio de recombinación cer y el pT7 tiene, además de cer el sistema de resolución de Tn1. Para los otros plásmidos derivados del pBR327

se esperaban datos similares; sin embargo, el pBR322 y el pBR327 están - prácticamente como dímeros, mientras que el pBR329 y el pI01 como monómeros. Como técnica auxiliar para evaluar el grado de multimerización de los plásmidos, se hizo microscopía electrónica del pI01. En la Figura - 14 se muestra dímero y monómero. Se analizaron 508 moléculas y se encontró 89.5% de monómero y 10.5% de dímero, dato semejante al reportado en la Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de especies moleculares de diferentes plásmidos tipo ColE1.

Plásmido	Especies moleculares (%)		
	Monómeros	Dímeros	Tetrámeros
ColE1	83.8	16.2	0
pT7	85.7	14.3	0
pI01	91.5	8.5	0
pBR322	0.4	92.6	7
pBR327	0	97.8	2.2
pBR329	89.8	10.2	0

5. DISTRIBUCION DE UNIDADES A REPARTIR

A partir de la distribución de copias (Fig. 10) y el grado de multimerización (Tabla 3), se obtuvo la distribución de unidades a repartir (Fig. 15).

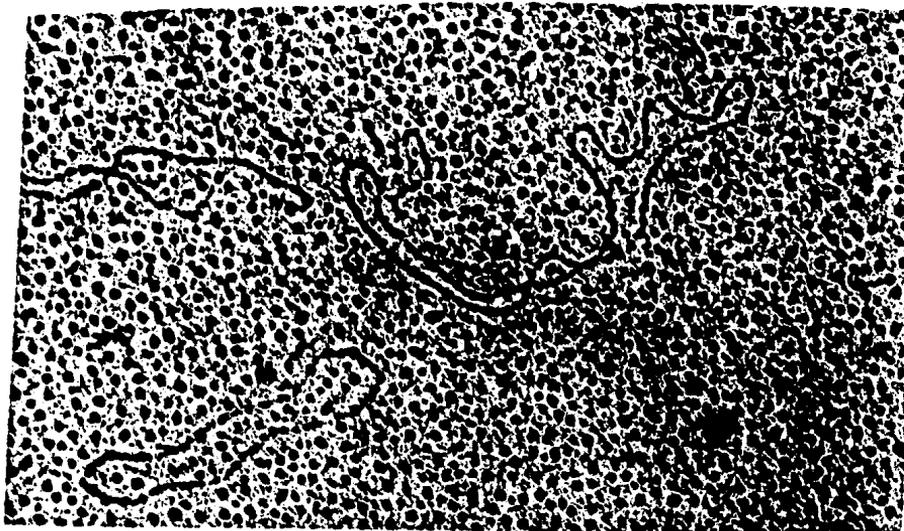


Figura 14. Microcopia electrónica de moléculas de PI01, tomada a ---
30 000 aumentos. M-monómero, D-dímero.

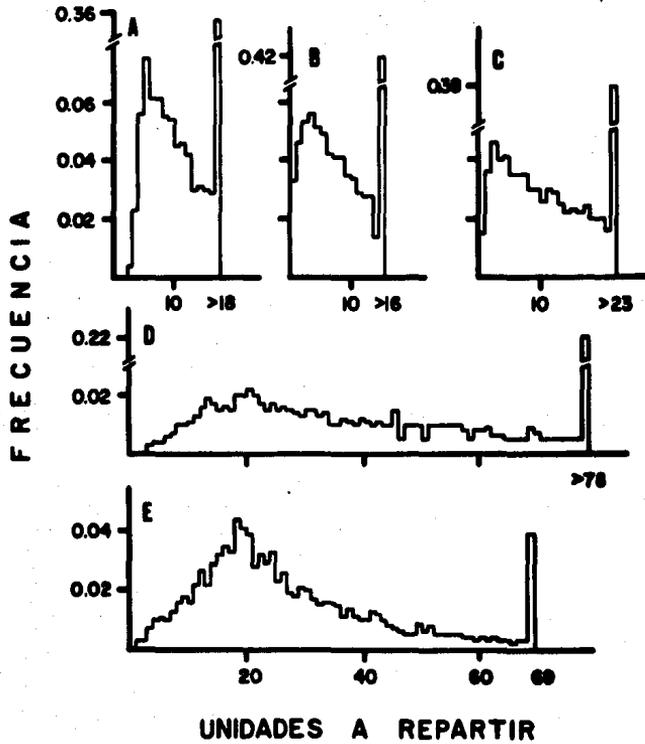


Figura 15. Distribución de unidades a repartir. A) pT7; B) pBR322; C) pBR327; d) pI01 y E) pBR329.

6. TIEMPOS DE GENERACION

Para determinar la ventaja o desventaja en el crecimiento de las células sin plásmido con respecto a las que lo tienen se hicieron --- curvas de crecimiento. La Tabla 4 muestra la relación de crecimiento entre las cepas con y sin plásmido.

Tabla 4. Relación de crecimiento de la cepa C600 con y sin plásmido.

Plásmido (a)	Tiempo de generación (b)	R (c)
----	2.469 \pm 0.142	1.000 \pm 0.115
ColE1	2.552 \pm 0.168	0.967 \pm 0.119
pT7	2.480 \pm 0.085	0.995 \pm 0.091
pI01	2.395 \pm 0.101	1.030 \pm 0.102
pBR322	2.440 \pm 0.328	1.010 \pm 0.193
pBR327	2.332 \pm 0.332	1.048 \pm 0.192
pBR329	2.469 \pm 0.131	1.019 \pm 0.113

a) De 9 a 16 experimentos excepto para la cepa C600 20 ex perimentos.

b) Pendiente de la curva de crecimiento

c) $R = \frac{\text{Tiempo de generación de C600}}{\text{Tiempo de generación de C600 con plásmido}}$

De los datos de la Tabla 4, no se puede decir que exista alguna ventaja o desventaja selectiva de las bacterias con plásmido sobre las que no lo tienen; pues las diferencias no son significativas.

7. CINÉTICAS DE PERDIDA DE LOS PLÁSMIDOS

Para cada plásmido se realizaron de 4 a 7 experimentos de cinética de pérdida. Estos experimentos se iniciaron con células que previamente se habían cultivado con presión selectiva, sin embargo, la presión selectiva no fue siempre la misma, en algunas ocasiones era tetraciclina y en otras ampicilina. Por otro lado con el tiempo estos antibióticos se degradan, y en el caso de la ampicilina las mismas bacterias degradan el antibiótico.

Comparando las curvas de cinética de pérdida de un mismo plásmido no se encontraba que en la misma generación hubiera el mismo porcentaje de pérdida. Esto podría explicarse tomando en cuenta la suposición de que la población llega a un equilibrio. Se vió que las diferentes -- curvas eran similares, lo que era diferente era el número de generaciones en que se inicia la pérdida, posiblemente por que en cada experimento la población tardó un tiempo diferente en llegar al equilibrio.

Los datos de la Figura 16 se elaboraron con cinéticas de más - de un experimento para cada cepa, la corrección se hizo tomando como estándar algún valor del porcentaje de pérdida vgr. para el p101 71% en la - generación 80. Para los otros experimentos a los valores cercanos a 71% (69-73%) se les asignó la generación ochenta y se sumó o restó la diferen - cia en generaciones. En la Figura 16 se grafican los datos experimenta-- les y la curva teórica, la interpretación y discusión de estos resultados se presentarán en la sección de discusión.

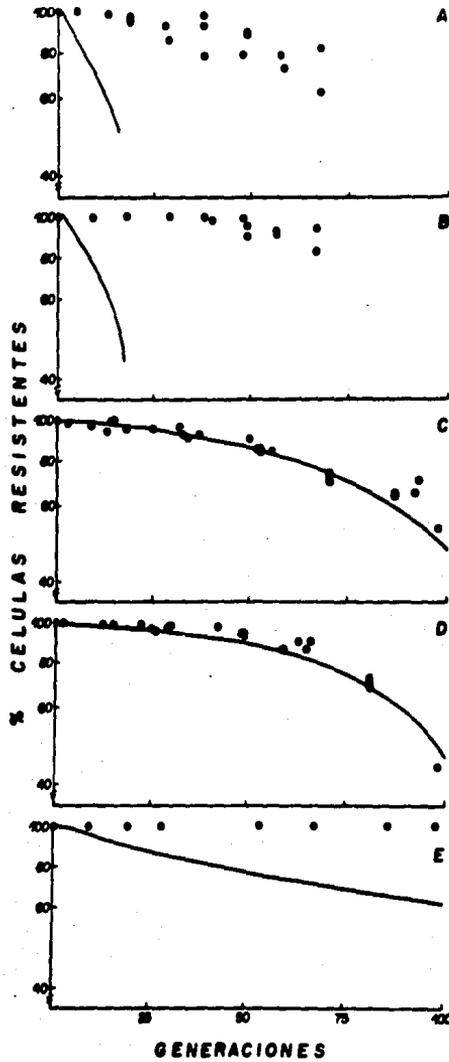


Figura 16. Cinéticas de pérdida. (o) puntos experimentales (—) curva teórica. A) pBR322; B) pBR327; C) pBR329; D) p101 y E) ColE1.

V

DISCUSION

Se han reportado varios mecanismos que influyen en la estabilidad de los plásmidos de bajo número de copias, como los sistemas de -- unión a membrana, recombinación sitio específica e inhibición de división celular. En el caso de los plásmidos multicopia tipo ColE1 el único mecanismo de estabilización bien estudiado es el de la resolución de multímeros por recombinación sitio específica. La estabilidad de los plásmidos tipo pBR322 ha sido menos estudiada e inclusive hay datos contradictorios en la literatura en cuanto a su grado de estabilidad (Noack y col. 1981).

En este trabajo se propuso y ensayó experimentalmente una hipótesis para explicar la estabilidad de plásmidos multicopia (más de 10 copias promedio por célula). Esta hipótesis propone que el único parámetro que determina la estabilidad de un plásmido multicopia es la distribución del número de unidades a repartir en la población de células cercanas a la división. Los plásmidos multicopia, a diferencia de los plásmidos de bajo número de copias, segregarían al azar; es decir que no requieren de unión a estructuras celulares. Para determinar la distribu--

ción de unidades a repartir en la población, se necesita cuantificar el número de copias por célula, su distribución y el grado de multimerización.

La hipótesis se ensayó usando al pT7, un derivado del ColE1 -- como control de plásmido estable y al pBR322 y algunos de sus derivados -- como plásmidos inestables.

A continuación se discuten las características relacionadas -- con estabilidad previamente reportadas para estos plásmidos, las predicciones en cuanto a las distribuciones de unidades a repartir según la hi hipótesis, los resultados obtenidos y su comparación con los resultados -- teóricos.

Del plásmido ColE1 se sabe que tiene de 8 a 18 copias por célula en promedio, que posee un sitio de recombinación sitio específica, car y que codifica para los represores RNAI y Rom y que es estable. -- Siendo ColE1 estable y con las características anteriores, se espera que su distribución de unidades a repartir de las células cercanas a la divi sión no presente subpoblaciones de alto riesgo de pérdida. El modelo -- del apéndice predice que una población en donde todas las células tienen un número de unidades a repartir de 12, en la generación 100, con el esquema experimental utilizado no se detectarían más de un 2.5% de células sin plásmido. Esto es factible dentro del rango reportado para el ColE1 de 8 a 18 copias por célula en promedio. Por otro lado, si car es un -- sistema de recombinación eficiente se esperaría la ausencia de multimeros.

En este trabajo se encontró un número de copias promedio de 11 que está dentro del rango esperado. La distribución de copias de la población de células cercanas a la división proporciona subpoblaciones con un número de copias suficientemente bajo como para causar pérdida medible en 100 generaciones (4 a 10 copias). Por otro lado se encontró una cantidad considerable de dímeros para ColE1 y pT7 (aproximadamente 15%). Los datos de dimerización son suficientemente confiables. Esto podría significar que en la cepa utilizada (C600), la recombinación sitio específica a nivel de la secuencia cer es parcialmente eficiente para monomerizar a ColE1, o que existe un sistema que favorece la formación de dímeros, pues el pT7 que tiene cer y el sistema de resolución de Tn1 presenta un porcentaje de dimerización similar al encontrado para ColE1.

Los datos experimentales dan como resultado una distribución con subpoblaciones de hasta 3 unidades a repartir, esto sería característico de un plásmido inestable como lo muestra su curva teórica (Fig. 16). Los datos de multimerización son confiables, mientras que las curvas de resistencia a ampicilina tienen desviaciones estándar muy grandes, y los errores en estas se reflejarían en errores en la distribución. Se podría intentar determinar las distribuciones usando tetraciclina que es un antibiótico no degradado por la bacteria, en vez de ampicilina ya que la tetraciclina aparentemente también presenta una relación directa de nivel de resistencia y número de genes. Por otro lado, los experimentos de determinación del número de copias por gradientes en cloruro de cesio tampoco son muy reproducibles. Sin embargo, una población estable debe de tener subpoblaciones con un número mínimo de 11 unidades a repartir, y la diferencia con la distribución experimental con hasta 3 unidades a

repartir, es muy grande como para explicar las diferencias por error experimental.

La distribución de unidades a repartir indica que si la segregación es al azar, el plásmido ColE1 debe de ser inestable; sin embargo, los plásmidos ColE1 y su derivado pT7 son estables en las condiciones -- experimentales utilizadas, esto sugiere que debe de haber un sistema de segregación tipo centrómero. Ya Kline y Miller (1975) y Kline y col. -- (1976) detectaron un porcentaje de moléculas de ColE1 que cosedimenta -- con el cromosoma de E. coli y que los derivados de ColE1 con fragmentos de DNA con secuencias invertidas repetidas se unen dos veces más al cromosoma (Kline y col. 1978). Esto podría sugerir que en el caso de ColE1, la unión plásmido-cromosoma, posiblemente a través de secuencias invertidas repetidas, es otro parámetro que contribuye a determinar la estabilidad de estos plásmidos.

Se sabe que los plásmidos derivados de pBR322 son inestables aunque existen condiciones en que el pBR322 y el pBR325 son estables -- (Noack y col. 1981), que sus números de copias son altos (Mayor que 20), que algunos de ellos poseen el represor Rom y otros no, estos últimos -- tienen un mayor número de copias, no se sabe si se unen a membrana o cromosoma, ni si tienen funciones análogas a car y par. Dentro de la hipótesis de partición al azar se esperaría que siendo inestables, las células cercanas a la división tuvieran subpoblaciones con un número de unidades a repartir con posibilidades de producir células sin plásmido (menor o igual a 10).

Se encontró que el pBR329 y el pI01 tienen un número de copias de 20 y 37 respectivamente y presentan un bajo porcentaje de dimerización (aproximadamente 10%), mientras que el pBR322 y el pBR327 tienen un número de copias mayor (61 y 74 respectivamente) y prácticamente todas las moléculas del plásmido son dímeros. Para estas diferencias se pueden -- proponer algunas explicaciones.

El número de copias más alto del pBR327 y pBR322 podría deberse a que los RNA transcritos a partir de promotores distales al promotor del RNA primero pueden llegar a la región del origen de la replicación y funcionar también como primeros. En estos plásmidos podrían funcionar el promotor de bla y el anti-tet que están relativamente próximos y que inducen transcripción hacia ori, mientras que en pI01 y pBR329 el gene de resistencia a cloramfenicol se intercala entre el promotor del gene bla y el promotor anti-tet y aleja más a este último de ori, por lo que disminuiría la posibilidad de que los RNA transcritos a partir del anti-tet funcionen como primeros; esto provocaría una disminución en el número de copias de estos plásmidos.

Esta explicación se apoya en el hecho de que pBR322 y pBR327 presentaron mayores niveles de resistencia a ampicilina (anti-tet cercano a bla) que el encontrado para pI01 y pBR329 (anti-tet lejano a bla).

Por otro lado, el pBR327 tiene más copias que el pBR322; esto se explica por el hecho de que pBR327 no tiene Rom y el pBR322 si, por -- tanto se replica menos. Sin embargo, es paradójico que el pI01 con Rom - tenga más copias que el pBR329 sin Rom. Se había propuesto que Rom podría

disminuir la varianza en el número de copias (Summers y Sherratt 1985); sin embargo, si se observan las distribuciones de la Figura 9, se ve que para pI01 con Rom hay mayor varianza que para pBR329 sin Rom. Por lo tanto es posible que la varianza sea inherente al sistema de replicación y que dependa más del número de copias, que de la presencia de la proteína Rom.

Con respecto al grado de dimerización diferente se puede pensar que la capacidad de la bacteria para recombinar los multímeros producidos por los propios sistemas de recombinación y por la terminación de la replicación es saturable, y con el alto número de copias del pBR322 y pBR327 se seleccionan los dímeros por poseer alguna ventaja selectiva para replicarse como ya se ha propuesto, y que este hecho, aunado a un sistema poco eficiente de generación de monómeros, desplace la población hacia dímeros.

Una posibilidad más, es que el gene de la cloramfenicol acetil transferasa posea secuencias de recombinación específica que no están en el pBR322 y pBR327. Se sabe que la secuencia Chi de 8 pares de bases -- (Smith y col. 1981) y secuencias similares a Chi (Cheng y Smith 1984) -- recombinan vía el sistema RecBC y que dichas secuencias no están en el pBR322. Estas secuencias se buscaron dentro del gene de resistencia a cloramfenicol pero no se encontraron. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que exista otro tipo de secuencias que favorezca la recombinación de pI01 y pBR329 con respecto a pBR322 y pBR327.

Con los datos de número de copias y multimerización se obtuvo la distribución de unidades a repartir. Estas distribuciones, junto con el factor R, se usaron para alimentar el programa de el modelo matemático del apéndice. Por otro lado se hicieron experimentos de cinética de pérdida para comparar las curvas teóricas con las experimentales. En -- todas las cinéticas experimentales se observa una curvatura negativa; -- esto sugiere que existe alguna desventaja para las células con plásmidos de alto número de copias con relación a las células sin plásmido. Aunque los valores de R tienen una desviación estandard tal que las diferencias no son significativas, esto último indica que sí hay una desventaja.

Las cinéticas teóricas y experimentales para pI01 y pBR329 -- concuerdan, mientras que las de pBR322 y pBR327 no. En este caso, otra vez la curva teórica predice una estabilidad menor que la encontrada experimentalmente. Esto podría deberse a errores en la distribución de unidades a repartir debido a la desviación estandard de las curvas de resistencia a ampicilina. Otra explicación que podría proponerse es que el -- grado de dimerización no sea homogéneo para todas las subpoblaciones, en donde las subpoblaciones con altas copias tienen plásmido preferencialmente en forma dimérica, mientras que las de bajas copias no han saturado los sistemas de recombinación y están como monómeros. Esto modificaría la distribución de unidades a repartir disminuyendo la fracción de -- subpoblaciones con bajo número de unidades a repartir, lo que se expresaría en una mayor estabilidad del plásmido. Esta explicación podría probarse cultivando células en un medio que seleccione a las subpoblaciones celulares con un alto número de copias (por ejemplo medio con una alta -

concentración de ampicilina o tetraciclina), y ver si en estas células - el número de multímeros es mayor que el encontrado para la población celular total. Otra posibilidad es que el modelo matemático no incluya -- parámetros importantes para determinar la estabilidad de estos plásmidos, pero como para pI01 y pBR329 sí correlaciona, posiblemente las discrepancias se deban a desviaciones por el alto número de copias, o a la dimerización que en este caso es la mayor diferencia entre los plásmidos pI01 y pBR329, y pBR322 y pBR327.

En resumen podemos concluir que los plásmidos pBR322 y pBR327 tienen un mayor número de copias que sus derivados pI01 y pBR329. Esto podría deberse a una mayor formación de primeros generados por transcripción a partir del promotor anti-tet. El sistema de recombinación sitio específico cer no es 100% eficiente en nuestras condiciones. Para células con un alto número de copias de un plásmido, existe un factor de desventaja (mayor tiempo de generación) con respecto a las células sin plásmido. Las distribuciones de unidades a repartir de los plásmidos pI01 y pBR329 tienen las características esperadas para un plásmido inestable, y sus cinéticas de pérdida son similares a las predichas por el modelo - de segregación al azar. Las distribuciones de unidades a repartir de -- los plásmidos pBR322 y pBR327 también tienen características de plásmido inestable, aunque la cinética de pérdida experimental es más lenta que la cinética teórica de segregación al azar. El pT7 es un plásmido estable cuya distribución de unidades a repartir tiene características de un plásmido inestable por lo que podría tener un sistema de partición adicional a cer que probablemente sea de unión a cromosoma.

VI

APENDICE

1. MODELO MATEMATICO

La probabilidad de aparición de una célula sin plásmido en un proceso al azar está definida por:

$$P = 2 \frac{1}{2^u} \quad (A-1)$$

donde u es el número de unidades a repartir del plásmido en la célula antes de dividirse, y la fracción de pérdida en esa población está determinada por:

$$f = \frac{P}{2} = \frac{1}{2^u} \quad (A-2)$$

Si la población está compuesta por un número m de distintas - subpoblaciones con número de unidades a repartir diferente en el momento de la división celular, con A-2 podemos obtener la frecuencia de pérdida de cada subpoblación. Conociendo la fracción de cada subpoblación en la población total, podemos encontrar la fracción de pérdida global de la - población por medio de A-3.

$$= \sum_{i=1}^m f_i s_i \quad (\text{A-3})$$

es la fracción de pérdida de la población total, m el número de subpoblaciones, f_i la fracción de pérdida de la subpoblación i ésima y s_i la fracción de la subpoblación i ésima en la población total. Es necesario asumir que la distribución de las unidades a repartir se encuentra en equilibrio. Con la ecuación A-3 se encuentra en una generación, si queremos saber la cinética de pérdida debemos tomar en cuenta a las células que han perdido plásmido en las generaciones anteriores como se expresa a continuación:

$$F_n = (1 - F_{n-1}) + F_{n-1} \quad (\text{A-4})$$

F_n es la fracción de pérdida en la generación n ésima y F_{n-1} en la generación anterior. Si existe un factor selectivo favorable para alguna de las poblaciones (con o sin plásmido), que provoque el crecimiento más rápido, la cinética sufrirá desviaciones positivas o negativas. El factor selectivo R es la relación entre el crecimiento de las células sin plásmido con respecto a las que lo poseen, así se deduce la ecuación A-5.

$$P_n = 1 - (F_{n-1})R + F_{n-1}R \quad (\text{A-5})$$

donde P_n es la fracción de pérdida de la generación n ésima.

2. SIMULACIONES

Se elaboró un programa en pascal del modelo (ecuación A-5) y se hicieron algunos ensayos para comprobar algunas predicciones del modelo.

- a) Dos plásmidos con el mismo número de copias promedio pero con diferente distribución, deben de perderse de manera diferente (Fig. 17).

- b) De dos plásmidos con el mismo número de copias pero diferente grado de multimerización el más multimerizado debe perderse - más rápido (Fig. 18).

- c) La ventaja o desventaja selectiva de la población con plásmido en relación a la población sin plásmido modifica la cinética - de manera positiva o negativa respectivamente (Fig. 19).

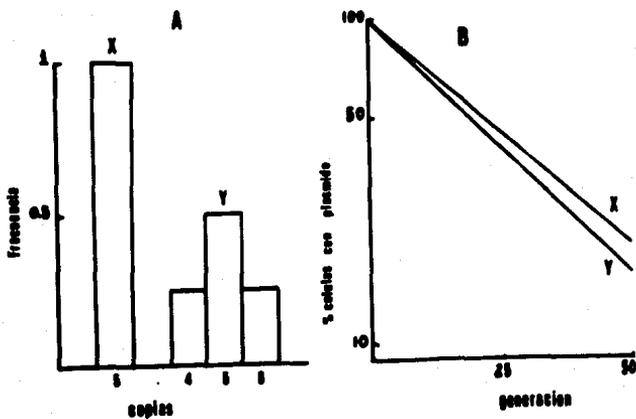


Figura 17. A) Distribución de copias de los plásmidos X y Y; B) Cinética de pérdida de los mismos.

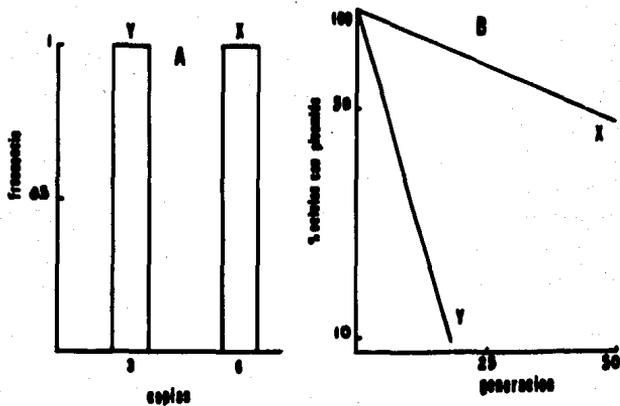


Figura 18. A) Distribución de unidades a repartir, X -- monómero Y dímero; B) Cinéticas de pérdida.

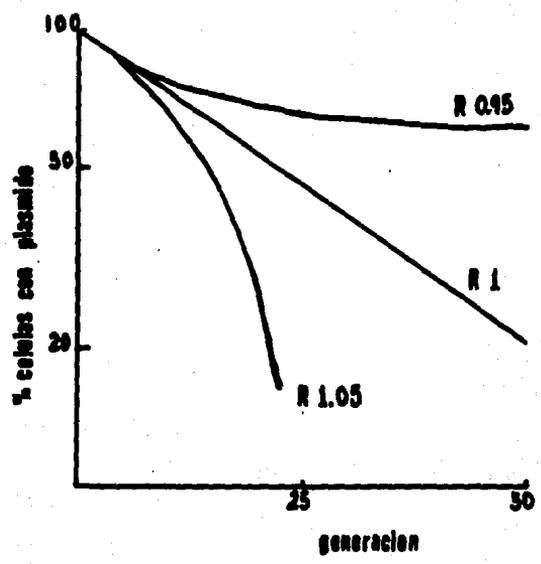


Figura 19. Cinéticas de pérdida para el plásmido X de la figura 17 con diferente factor de selección.

VII

REFERENCIAS

- Austin S. and Abeles A. (1983a). The partition of unit copy miniplasmids to daughter cells. I. Pl and F miniplasmids contain discrete, interchangeable sequences sufficient to promote equipartition. *J. Mol. Biol.* 169: 353-372.
- Austin S. and Abeles A. (1983b). The partition of unit copy miniplasmids to daughter cells. II. The partition region of miniplasmid Pl encodes an essential protein and a centromere-like site at which it acts. *J. Mol. Biol.* 169: 373-387.
- Austin S., Ziese M. and Sternberg N. (1981). A novel role for site specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25: 729-736.
- Bazara M., Helinski D.R. (1968). Circular forms of colicinogenic factors E1, E2 and E3 from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 36: 185-194.

Bolivar F., Rodriguez L.R., Betlach C.M. and Boyer H.W. (1977a).

Construction and characterization of new cloning vehicles.

I. Ampicillin-resistance derivatives of the plasmid pMB9.

Gene 2: 75-93.

Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L. and
Boyer H.W. (1977b). Construction and characterization of new
cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.

Gene 2: 95-113.

Cesareni G., Muesing M.A. and Polisky B. (1982). Control of ColE1 DNA

replication: The rop gene product negatively affects

transcription from the replication primer promoter. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 79: 6313-6317.

Cheng K.C. and Smith G.R. (1984). Recombinational hotspot activity of

chi-like sequences. J. Mol. Biol. 180: 371-377.

Cohen S.N., Chang A.C.Y. and Hsu L. (1972). Nonchromosomal antibiotic

resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia

coli by R-Factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114.

Covarrubias L. and Bolivar F. (1982). Construction and characterization

of new cloning vehicles. VI. Plasmid pBR329, a new derivative

of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication.

Gene 17: 79-89.

- Dambara H., Brady G, Timmis J.K. and Timmis K.N. (1981). Regulation of DNA replication: "Target" determinant of the replication control elements of plasmid R6-5 lies within a control element gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4699-4703.
- Davis R.W., Simon M. and Davidson N. (1971). Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. Methods in enzymology 21: 413-428 (Grossman and Moldave K. Ed.) Academic Press.
- Davison J. (1984). Mechanism of control of DNA replication and incompatibility in ColE1-type plasmids - a review. Gene 28: 1-15.
- Dougan G. and Sherratt D. (1977). The transposon Tn1 as a probe for studying ColE1 structure and function. Molec. Gen. Genet. 151: 151-160.
- Gerdes K., Larsen J.E.L. and Molin S. (1985). Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. J. Bact. 161: 292-298.
- Gustafsson P., Wolfwatz H., Lind L., Johansson K. and Nordström K. (1983). Binding between the par region of plasmids R1 and pSC101 and the outer membrane fraction of the host bacteria. EMBO J. 2: 27-32.
- Hakkaart M.J.J., Van den Elzen P.J.M., Velkamp E. and Nijkamp H.J.J. (1984). Maintenance of multicopy plasmid Clo DF13 in E. coli cells: Evidence for site-specific recombination at parB. Cell 36: 203-209.

- Hakkaart M.J.J., Veltkamp E. and Nijkamp H.J.J. (1982). Maintenance of the bacteriocinogenic plasmid CloDF13 in Escherichia coli cells. II. Specific recombination functions involved in plasmid maintenance. Mol. Gen. Genet. 188: 338-344.
- Hiraga S., Ogura T., Mori H. and Tanaka M. (1985). Mechanisms essential for stable inheritance of mini-F plasmid. In "Plasmids in Bacteria" (Helinski D.R., Cohen S.N., Clewell D.B., Jackson D.A. and Hollander A. Eds.) pp: 469-487 Plenum Press New York and London.
- Hoess R., Ziese M. and Sternberg N. (1982). P1 site-specific recombination: Nucleotide sequences of the recombining sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3398-3402.
- Itoh T. and Tomizawa J. (1980). Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2450-2454.
- Jacob F., Brenner S. and Cuzin F. (1963). On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 329-348.
- Kline B., Manis J., Miller M., Wlodarczyk M. and Cress D.E. (1978). Nonintegrated plasmid-chromosome complexes and plasmid replication. Microbiology-1978 (Schessinger D. Ed.) pp: 85-87. Amer. Soc. for Microbiol. Washington D.C.

- Kline B.C. and Miller J.R. (1975). Detection of nonintegrated plasmid deoxyribonucleic acid in the folded chromosome of Escherichia coli Physicochemical approach to studying the unit of segregation. *J. Bact.* 121: 165-172.
- Kline B.C., Miller J.R., Cress D.E., Wlodarczyk M., Manis J.J. and Otten M.R. (1976) Nonintegrated plasmid-chromosome complexes in Escherichia coli. *J. Bact.* 127: 881-889.
- Komai N., Nishizawa T., Hayakawa Y., Murotsu T. and Matsubara K. (1982). Detection and mapping of six mini-F-encoded proteins by cloning analysis of dissected mini-F segments. *Mol. Gen. Genet.* 186: 193-203.
- Krivanogov S.V. (1984). The recF-dependent endonuclease from Escherichia coli K12. Formation and resolution of pBR322 DNA multimers. *Mol. Gen. Genet.* 169: 105-109.
- Lacatena R.M., Banner D.W., Castagnoli L. and Cesareni G. (1984). Control of initiation of pMB1 replication: Purified Rop protein and RNAI affect primer formation in vitro. *Cell* 37: 1009-1014.
- Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. (1982). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Meacock P.A. and Cohen S.N. (1980). Partitioning of bacterial plasmids during cell division. A cis acting locus that accomplishes stable inheritance in cell populations. *Cell* 20: 529-542.

- Miki T., Yoshioka K. and Horiuchi T. (1984). Control of cell division by sex factor F in Escherichia coli. I. The 42.84-43.6 segment couples cell division of the host bacteria with replication of plasmid DNA. J. Mol. Biol. 174: 605-625.
- Miller C.A., Tucker W.T., Meacock T.A., Gustafsson P. and Cohen S.N. (1983). Nucleotide sequence of the partition locus of Escherichia coli plasmid pSC101. Gene 24: 309-315.
- Morita M. and Oka A. (1979). The structure of a transcriptional unit of colicin E1 plasmid. Eur. J. Biochem. 97: 435-443.
- Noack D., Roth M., Geuther R., Müller G., Undisz K., Hoffmeier C. and Gáspár S. (1981). Maintenance and genetic stability of vector plasmids pBR322 and pBR325 in Escherichia coli K12 strains grown in a chemostat. Mol. Gen. Genet. 184: 121-124.
- Nordström K. (1983). Control of plasmid replication: A synthesis occasioned by the recent EMBO workshop "Replication of prokaryotic DNA". Held at the Eeshof, The Netherlands. May 1982. Plasmid 9: 1-7.
- Ogura T. and Hiraga S. (1983a). Partition mechanism of F plasmid: two plasmids gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. Cell 32: 351-360.
- Pritchard R.H. (1969). Control of replication of genetic material in bacteria. In "Bacterial episomes and plasmids" (Wolstenholme G.E.W. and O'Connor M. Eds.) Ciba Foundations Symposium, pp: 65-74 Churchill, London.

- Pritchard R.H., Barth P.T. and Collins J. (1969). Control of DNA synthesis in bacteria. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 19: 263-297.
- Projan S.J., Carleton S. and Novik R.P. (1983). Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. Plasmid 9: 182-190.
- Smith G.R., Kunes S.M., Schults D.W., Taylor A. and Triman K.L. (1981). Structure of chi hotspots of generalized recombination. Cell 24: 429-436.
- Soberón X., Covarrubias L. and Bolivar F. (1980). Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. Gene 9: 287-305.
- Summers D.K. and Sherratt D.J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes stability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. Cell 36: 1097-1103.
- Summers D.K. and Sherratt D.J. (1985). Stability functions of ColE1, In "Plasmids in bacteria" (Helinski D.R., Cohen S.N., Clewell D.B., Jackson D.A. and Hollander A. Eds.). p: 909 Plenum Press New York and London.
- Tomizawa J. (1984). Control of plasmid ColE1 replication: The process of binding of RNAI to the primer transcript. Cell 38: 861-870.

- Tomizawa J. (1985). Control of ColE1 plasmid replication: Initial interaction of RNAI and the primer transcript is reversible. Cell 40: 527-535.
- Tomizawa J., Itoh T., Selzer G. and Som T. (1981). Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid specified small RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1421-1425.
- Tomizawa J. and Som T. (1984). Control of ColE1 plasmid replication: Enhancement of binding of RNAI to the primer transcript by the Rom protein. Cell 38: 871-878.
- Tucker W.T., Miller C.A. and Cohen S.N. (1984). Structural and functional analysis of the par region of the pSC101 plasmid. Cell 38: 191-201.
- Uhlir B.E. and Nordström K. (1977). R plasmid gene dosage effects in Escherichia coli K12 copy mutants of the R plasmid R1 drd-19 Plasmid 1: 1-7.
- Van den Elzen P.J.M., Hakkaart M.J.J., Van Putten A.J., Walters H.H.B., Veltkamp E. and Nijkamp H.J.J. (1983). Structure and regulation of gene expression of a CloDF13 plasmid DNA region involved in plasmid segregation and incompatibility. Nucl. Acids Res. 11: 8791-8808.
- Wehlmann H. and Eichnlaub R. (1980). Plasmid mini-F encoded proteins. Mol. Gen. Genet. 180: 205-211.

Weislander L. (1979). A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. *Anal. Biochem.* 98: 305-309.

Womble D.D., Taylor D.P. and Round R.H. (1977). Method for obtaining more-accurate covalently closed circular plasmid-to-chromosome ratios from bacterial lysates by dye-buoyant density centrifugation. *J. Bact.* 130: 148-153.