

03062

7  
24

Universidad Nacional  
Autonoma de México

-----  
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH.

ESTUDIO DE LOS FACTORES  
INVOLUCRADOS EN LA RE-  
COMBINACION MEDIADA POR  
LA SECUENCIA DE INSER-  
CION ISI EN PLASMIDOS FII.

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
P R E S E N T A

EL BIOLOGO MARTIN IGNACIO GARCIA CASTRO



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.

# ESTUDIO DE LOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LA RECOMBINACION MEDIADA POR LA SECUENCIA DE INSERCIÓN IS1 EN PLÁSMIDOS FII.

## INDICE

INDICE...	1	Metodos de Genéticabacteriana...	52-54
RESUMEN...	11	Cultivos bacterianos...	52
INTRODUCCION...	1-48	Conservación de cepas...	52
Dinámica de los genomas...	1	P1, Propagación, titulación lisogenia y transducción...	52
Dinámica del DNA...	1	Cuentas viables...	53
Mutación...	1-3	Conjugación...	53
Recombinación homóloga...	3	Transformación...	53
Recombinación sitio específica...	3	Sensibilidad al fago R17...	54
Transposición...	4	Verificación del fenotipo HimA...	54
Elementos Mviles...	4-17	Titulación del fago lambda...	54
Descubrimiento...	4	Prueba de marcadores de resistencia a antibióticos...	54
Características...	6-7	Metodos de biología molecular...	55-56
Clasificación...	8-11	Visualización de los plásmidos...	55
Mecanismos de transposición...	13-17	Topoisómeros...	55
IS1...	17-38	Recombinación de plásmidos FII...	56
Descubrimiento...	17	Recombinación de pequeños plásmidos multicopia...	56
Distribución...	18	Disociación del R100t...	56
Esquema general de transposición...	19	RESULTADOS...	57-77
Secuencia de la IS1, sus extremos y sus sitios cis...	19-21	Modelo experimental...	57-58
Marcos de lectura abiertos, transcripción y actividad...	22-26	Efecto de la información genética del RTF en la disociación...	59-61
Las proteínas de IS1...	26	Disociación del R100t en cepas de <i>E.coli</i> y <i>S.typhimurium</i> con dife- rente número de copias de IS1...	62-65
Regulación...	27-28	Efecto de los genes <i>dor</i> y <i>hima</i> sobre la disociación de los pFII en <i>E.coli</i> ...	66-67
Factores independientes de IS1 que operan sobre la transposición de esta secuencia...	28-34	Efecto de la Novobiocina en la diso- ciación de los pFII en <i>E.coli</i> y <i>S.typhimurium</i>	68-73
Rho...	28	Efecto del gene <i>dor</i> en la recombi- nación homóloga de plásmidos...	74-77
DNA Pol...	29	FII...	74-76
Topoisomerasas...	30	pBX404-7...	76-77
Dna A...	30	DISCUSION...	78-85
IHF...	31-34	Efecto del replicon en la disociación...	78-80
Efectos generados por la IS1...	34-37	Efecto del # de copias de IS1 en la disociación...	80-83
Algunas consideraciones sobre el modelo de transposición...	37-38	Efecto de los genes <i>dor</i> y <i>him A</i> en la disociación...	83
Plásmidos...	39-40	Y de la Novobiocina...	84-85
Plásmidos FII...	41-47	CONCLUSIONES...	86
Descubrimiento...	41		
Descripción...	42	BIBLIOGRAFIA...	88-91
Disociación...	43-47		
OBJETIVOS...	48		
MATERIAL Y METODOS...	49-56		
Soluciones y medios...	49		
Cepas bacterianas, plásmidos y fagos...	50-51		

## RESUMEN

La Secuencia de Inserción IS1 (IS1) es uno de los Elementos Móviles más pequeños que se conocen, mide tan solo 768pb. A pesar de su tamaño, este elemento es sumamente complejo, posee más de 8 marcos de lectura abiertos capaces de codificar para péptidos de cuando menos 50 aminoácidos. Este elemento se encuentra presente en plásmidos y cromosomas de diversas enterobacterias; como otros elementos móviles, genera una gran variedad de eventos moleculares (reacomodo, duplicación, delección e inserción de material genético). Uno de los eventos más estudiados de este elemento es la disociación de los plásmidos FII.

Los plásmidos conjugativos del grupo de incompatibilidad FII como el R1-19 y el R100, estan formados por 2 regiones funcionalmente distintas: a) RTF con informacion de transferencia y repliacion del plásmido, y b) r-det portadora de la mayoria de los genes de resistencia a antibioticos presentes en estos plásmidos. La región r-det esta flanqueada por dos secuencias de inserción IS1. Las dos regiones RTF y r-det se disocian y rearreglan por recombinacion mediada por las IS1.

La disociación de los pFII ocurre a una frecuencia muy alta en S.typhimurium, dos ordenes de magnitud por arriba de su frecuencia en E.coli.

En este trabajo se estudiaron algunos de los factores involucrados con el evento de disociación, con el proposito de entender mejor este proceso, y tratar de identificar las posibles razones del comportamiento diferencial entre S.typhimurium y E.coli. Se investigó el efecto del replicón en el que se efectua la disociación, y se determino que este elemento afecta su frecuencia y regulacion. Se intentó detectar actividades en trans que modificaran la disociación, codificadas por la IS1, pero no fue posible en este sistema, por lo que se postula que si acaso existen tales actividades en trans, su efecto es mínimo. Tambien se estudió el efecto de los genes himA y dor en este evento, así como el efecto de la Novobiocina (inhibidor de la subunidad B de la Girasa (Topoisomerasa II). Los resultados indican que se requiere de los genes silvestres dor y himA, y de un superenrollamiento específico para que se lleve a cabo la disociación. Por último, se estudió el efecto tanto de dor como de la novobiocina en la recombinación homóloga de plásmidos pequeños multicopia y de grandes plásmidos unicopia; lo que nos permite afirmar que dor no afecta la recombinación homóloga plasmídica, y nos permite suponer que su efecto es a traves de la secuencia IS1.

## INTRODUCCION

Los genomas eucariontes y procariontes son relativamente estáticos; es decir, cambian bajo la pausada escala de tiempo de la evolución, bajo una presión de selección sobre las secuencias de DNA esenciales, lo que limita la dinámica de estos sistemas (Lewin 1990, Watson et.al 1987).

La estabilidad de la organización genética es evidente al comparar los mapas genéticos de organismos próximos como el del Hombre y los Simios, o en el caso de organismos procariontes como las bacterias Escherichia coli y Salmonella typhimurium. Entre estos organismos existe un alto porcentaje de similitud en las secuencias de DNA y un orden también similar en los genes que los componen. Sin embargo, las pocas diferencias que se pueden observar entre estos sistemas, surgieron gracias a procesos que modifican el DNA.

La adquisición o pérdida de secuencias, o la modificación de las mismas, son los mecanismos esenciales para generar la diversidad genética, materia prima de la especiación.

La fidelidad con la que las secuencias de DNA se mantienen, ha sido estudiada tanto en eucariontes como en procariontes. Actualmentes se conocen los mecanismos esenciales a través de los cuales las secuencias de DNA pueden sufrir daños o modificaciones (mutación , recombinación y transposición).

Mutación.-Cambio en las secuencias de DNA. Estos cambios pueden deberse a agentes físicos, químicos y a la propia actividad de las enzimas que actuan sobre el DNA (enzimas de

replicación, reparación, recombinación y transposición entre otras). El número de eventos que modifican al DNA es considerable. Sin embargo, los sistemas biológicos cuentan con sistemas de verificación de errores y reparación de daños (verificación post-replicativa de las DNA polimerasas, reparación de apareamiento erróneo de bases, reparación de cortes y deleciones en cadenas de DNA, y hasta sistemas completos de reparación para daños generales como el sistema S.O.S.).

A pesar de estos mecanismos para garantizar la fidelidad de la información genética, algunas modificaciones no son reparadas. La eficiencia enzimática de los sistemas de verificación y reparación, es conocida, así como la frecuencia de aparición de errores generados enzimáticamente. Con base en lo anterior, se han calculado los daños y las reparaciones esperadas, y la proporción entre éstas, la cual genera la tasa de mutación esperada (la cantidad de modificaciones que se espera que evadan los sistemas de reparación). Sin embargo, la mutación esperada es mucho mayor que la que detectamos.

Lo anterior significa que únicamente algunos de los eventos moleculares que modifican al genoma de manera importante (adquisición de nuevas secuencias, modificación de las existentes, etc.) se expresan, ya que muchas de estas modificaciones son seleccionadas negativamente (Lewin 1990, Alberts et.al. 1983, Darnell et.al 1990, Gómez 1983).

Las mutaciones espontáneas (modificaciones espontáneas de la secuencia de DNA, generadas por el metabolismo del DNA), que escapan a los mecanismo de corrección, eran consideradas anteriormente como la única fuente de variación del DNA. Los

descubrimientos de la recombinación genética y la transposición, revolucionaron el esquema anterior de modificaciones al DNA.

Los mecanismos de recombinación genética, permiten que grandes regiones de DNA con mucha o poca homología sean intercambiadas entre replicones. Gracias a la transposición, secuencias de DNA se mueven de un sitio a otro en el mismo o en diferentes replicones. Este evento, pone en contacto regiones de DNA con poca o nula homología.

- La **Recombinación General u Homóloga**, implica la interacción, apareamiento e intercambio de bases entre dos cadenas homólogas de DNA. Las cadenas de DNA involucradas pueden ser dos de doble hélice o bien una de doble hélice y una sencilla. Este intercambio raras veces genera modificaciones en la secuencia original de las moléculas involucradas, ya que normalmente se lleva a cabo en regiones homólogas, de moléculas homólogas. Actualmente, en E.coli se conocen cuando menos dos sistemas de recombinación propios y uno cuyo origen probablemente sea un fago (RecBCD, RecF y RecE respectivamente) También se conoce la proteína RecA, esencial casi en todos los sistemas de recombinación homóloga. En la Tabla 1 se presentan los sistemas de recombinación homóloga que se conocen en E.coli, las proteínas y moléculas involucradas, algunos de sus requisitos y sus funciones conocidas.

- La **Recombinación Sitio Específica** a diferencia de la anterior, no depende de grandes regiones de homología. En este sistema, que requiere de un número pequeño de bases similares en las dos moléculas de DNA (<10pb), se intercambian secuencias alteran-

do los patrones originales de DNA. Un ejemplo de estos eventos es la integración y la escisión del bacteriófago lambda en sitios específicos del cromosoma de E.coli. También se conocen secuencias que por recombinación sitio específica, pueden cambiar su orientación. El cambio de orientación de una secuencia de DNA y su efecto en la expresión de genes vecinos da origen a la especificidad de huésped del fago Mu, y a la variación de proteínas flagelares en S.typhimurium.

TABLA 1.- SISTEMAS DE RECOMBINACION EN E.coli.

	RecBCD	RecF	RecE
Genes involucrados en la recombinación (Rec) conjugacional	recA,B,C,D,	recA,F,J, N,O,Q,Ruv	recA,E,F, J,O,Q,
Participación en rec. conjugacional y transduccional en células silvestres	+++	±	-
Mutaciones activadoras de sistemas para la rec. conjugacional y transduccional	-	sbcB,C	sbcA
Participación en rec plasmídica en células... - silvestres	-	+++	-
Requiere o implica extremos de doble cadena de DNA	Si	No	No
Secuencia que reconoce y activa	Chi	Fre	-
RECOMBINACION PLASMIDICA INDEPENDIENTE DE recA EN PLASMIDOS PEQUEÑOS:			
a) intraplasmídica	-	-	+
b) inter-intraplasmídica en mutantes sbcA- (RecE+)	-	-	+++



- La **Transposición** es una propiedad de las secuencias de DNA denominadas **elementos genéticos móviles**, la cual les permite movilizarse hacia secuencias de DNA con poca o nula homología. Los **ELEMENTOS GENETICOS MOVILES (EM)**, juegan un papel muy importante en la dinámica molecular de la información genética. Son secuencias de DNA capaces de insertarse (transposición conservativa) o insertar una copia (transposición replicativa), en otra región de la molécula de DNA donde se localizan o en una molécula vecina de DNA. Esta movilización se denomina **TRANSPOSICION**. La transposición de un EM bloquea la transcripción o traducción adecuada del gene en el que se insertan, y gracias a esta propiedad fueron descubiertos. Estos elementos afectan tanto a la secuencia receptora como a las secuencias vecinas generando inversiones, duplicaciones, deleciones, y frecuentemente cambios en los patrones de regulación de la expresión genética (Kleckner 1981, Lewin 1990, Fedorof 1989 y Watson et.al. 1987).

El descubrimiento de las secuencias móviles de DNA se remonta casi 50 años. En 1956 Bárbara McClintock propuso la existencia en maiz de elementos genéticos que se movían dentro del genoma, lo que inducía cambios detectables en la expresión genética y causaba rearrreglos cromosomales. Sin embargo, fue hasta 1968 cuando Jordan et.al. identificaron por vez primera la inserción de elementos genéticos discretos en el operón gal de E.coli. A este reporte le siguieron el de Shapiro en 1969 y el de Brachet et.al. en 1970, los cuales también reportaban inserciones de secuencias de DNA de tamaños específicos en el operón lac, y en los genes tempranos del bacteriofago lambda. Los tres

grupos descubrieron estas secuencias al estudiar ciertas mutaciones espontáneas con propiedades diferentes a las conocidas entonces. Estas mutaciones revertían espontáneamente con la misma frecuencia que una mutación puntual; sin embargo no revertían con agentes mutagénicos, no eran supresibles y finalmente, eran mas polares que las mutaciones sin sentido descritas.

La primer pista en torno a la naturaleza de estas mutaciones, provino del análisis comparativo de particulas virales de fagos lambda silvestres y mutantes, en gradientes de cloruro de cesio. Los fagos mutantes resultaron ser mas densos, y como todas las cápsulas virales eran iguales (mismo tamaño y peso), el incremento en la densidad, debia responder a un aumento en la cantidad de DNA.

El manejo de los fagos en esa época, permitió la elaboración y el entendimiento de modelos de inserción a pesar de no contar con las técnicas actuales de biología molecular. Los Fagos lambda gal transductantes llevaban estas mutaciones; su purificación y comparación con los fagos silvestres demostró que poseian DNA extra. El análisis de heteroduplex de estos fagos por microscopia electrónica hizo posible determinar que la inserción siempre era de un tamaño preciso, y que podia ocurrir en diferentes sitios y orientaciones (Hirsch et.al., Malamy et.al. y Fiandt etal., 1972).

Desde entonces se estudia el evento de transposición, y se han elaborado modelos moleculares muy completos. Además, se han identificado un sinnúmero de elementos móviles en practicamente todos los sistemas biológicos. Actualmente no es raro que se reporte el descubrimiento fortuito de nuevos elemen-

tos móviles. En bacterias gram negativas se conocen cuando menos 43 Secuencias de Inserción (se describen mas adelante). El avance en su estudio, incluye a los elementos procarióticos como el Tn3, Tn5, Tn7, Tn10, Mu, IS1, IS5, etc. y a los eucarióticos Ty, Spm, P, Copia, Tu, LINEs, y SINEs entre otros. Su estudio ha dado grandes frutos en el campo de la dinámica de moléculas de DNA (Lewin 1990, Watson et.al. 1987, Klecner 1981).

El bacteriofago Mu, es un EM que posee la capacidad de abandonar a su hospedero, pero la mayoría de los EM no pueden hacerlo. Estos últimos poseen sistemas de auto control en su movimiento, pues de no ser así, causarían un gran número de modificaciones en el DNA de su hospedero, las cuales pondrían en riesgo la supervivencia de su hospedero, y de ellos mismos (Lewin 1990, Galas y Chandler 1989 y Watson et.al1987). En células bacterianas, la transposición es estrictamente regulada a niveles muy bajos ( $10^{-4}$  a  $10^{-9}$  por ciclo de división, Kleckner 1981). Algunos transposones poseen por esta razón, genes o secuencias para una regulación negativa que interfiere con la capacidad de transponer (Machida y Machida 1989).

Básicamente todos los EM bacterianos poseen la misma estructura. Se trata de moléculas discretas de DNA. Sus extremos son secuencias Invertidas Repetidas ((IR) excepto las del fago MU, y del Tn554). Estos elementos tienen cuando menos un marco de lectura abierto, el cual codifica para una proteína capaz de reconocer dichos extremos, y de transponer al elemento a una molécula receptora. Esta proteína es conocida como transposasa (Cohen y Shapiro 1980). Además, cuando un elemento se mueve a un

nuevo sitio, normalmente se genera una duplicación pequeña de la secuencia receptora. Es decir, están flanqueados por una secuencia de tamaño preciso para cada elemento, repetida en la misma dirección en cada uno de sus extremos. Esta secuencia, diferente en cada sitio de inserción, es aparentemente el resultado de la reparación de los cortes asimétricos ("pegajosos") generados por la transposasa en el sitio de inserción y reflejan por lo tanto, un mecanismo de transposición similar. Hasta ahora, solamente el Tn<sub>554</sub> escapa a la regla general de la pequeña duplicación de la secuencia receptora (Murphy *et.al.* 1985).

Dentro de los EM bacterianos se conocen dos tipos: los **Transposones (Tn's)**, que portan información adicional a la involucrada con la transposición (normalmente secuencias que codifican para la resistencia a antibioticos) y las **Secuencias de Inserción (IS's)**, las cuales no portan mas genes que los involucrados con la transposición. Cuando dos secuencias de inserción iguales flanquean otros genes, pueden moverse, como una unidad, las dos IS's con el material genético interior como si fuese un "pasajero". Este tipo de Tn se denomina Tn Compuesto (Cullum J.1985).

Las Secuencias de Inserción, tienen entre 700 y 2500pb, su número de copias por hospedero varia desde unas cuantas, hasta decenas por genoma. Estas secuencias son frecuentes en plásmidos naturales, en los que están asociadas con genes de resistencia a antibioticos, formando transposones que confieren resistencia a drogas (Galas y Chandler 1989).

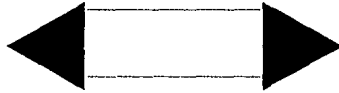
No existe actualmente un consenso sobre la clasificación de las secuencias de inserción o transposones; sin embargo,

# ELEMENTOS MOVILES

## TRANSPOSON



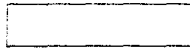
## SECUENCIA DE INSERCIÓN



## TRANSPOSON COMPUESTO



Extremos Invertidos Repetidos



Genes involucrados con la transposición



genes adicional (comunmente resistencia a antibioticos)

en 1988 Syvanen propuso un sistema de clasificación que incluye a 28 de las secuencias de inserción y transposones mas estudiados en bacterias. Este sistema de cuatro grupos, contempla diferentes propiedades, pero enfoca su atención en la similitud entre las transposasas de sus miembros (Tab. 2). A continuación se presentan algunas de las características de estos grupos:

Grupo 1.- En este grupo, los elementos cuentan con un solo marco de lectura abierto para la transposasa. Las transposasas presentan una estructura secundaria conservada. En el subgrupo 1a, esta estructura es de 5aa en Beta, seguidos de 10aa en Hélice Alpha, un espacio intermedio sin estructura de 4aa, y concluye con el consenso de Tyr...Glu<sub>7</sub>...Lys<sub>14</sub> que forma una Helice Alpha. El subgrupo 1b, sólo posee cierta homología con respecto a la transposasa del 1a, conserva la ultima Hélice Alpha, Tyr...Glu<sub>7</sub>...Lys<sub>14</sub>.

Grupo 2.- En varios de los miembros de este grupo, el patrón de transcritos esta sobrelapado. Las transposasas de los EM del subgrupo 2a, no presentan ninguna similitud en su transposasa, mientras que las del subgrupo 2b si. Sin embargo, aun no se cuenta con el análisis de su estructura secundaria. Las transposonasas del subgrupo 2c, tienen una región similar de 300aa, de los cuales casi el 30% coinciden perfectamente.

Los grupos 3 y 4 comparten la cualidad de codificar para genes accesorios en la unidad transponible mas pequeña.

Grupo 3.- Los miembros de este grupo poseen ademas de transposasa, una resolvasa, la cual participa en la resolución de los cointegrados generados por la transposasa. Ademas, comparten

similitud en la transposonasa, resolvasa, extremos terminales, y sitios de resolución. Solamente en este grupo se ha demostrado la transposición replicativa.

Grupo 4.- Estos elementos portan 3 genes que codifican para su transposasa, no forman cointegrados, ni poseen resolvasa, además se transponen en sitios específicos.

TABLA 2.-CLASIFICACION DE LOS ELEMENTOS MOVILES (a)

GRUPO	EM	EM similares	Huesped
1a	<u>IS4</u>		<u>E.coli</u>
	<u>IS10</u>	<u>Tn10</u> <u>Tn2921</u>	<u>Enterobacterias</u>
	<u>IS50</u>	<u>Tn5</u>	<u>Enterobacterias</u>
	<u>IS186</u>		<u>E.coli</u>
	<u>IS231</u>	<u>Tn4430</u>	<u>Bacillus thuringiensis</u>
	<u>ISH1</u>		<u>Halobacter sp</u>
1b	<u>IS26</u>	<u>IS15</u> <u>IS46</u> <u>IS160</u> <u>Tn2680</u> <u>Tn1525</u>	<u>Enterobacterias</u>
	<u>IS52</u>		<u>Pseudomonas sp</u>
	<u>IS903</u>	<u>IS102</u> <u>Tn903</u> <u>Tn602</u>	<u>Enterobacterias</u>
2a	<u>IS1</u>	<u>Tn9</u>	<u>E.coli</u>
	<u>IS5</u>		<u>E.coli</u>
	<u>IS66</u>		<u>Agrobacterium tumefaciens</u>
	<u>IS91</u>		<u>E.coli</u>
	<u>IS200</u>		<u>Salmonella typhimurium</u>
	<u>ISH2</u>		<u>Halobacter sp</u>
	<u>ISH50</u>		<u>Halobacter sp</u>
	<u>ISH51</u>		<u>Halobacter sp</u>
	<u>ISM1</u>		<u>Methanobrevibacter sp</u>
(continuación TABLA 2)			
2b	<u>IS2</u>		<u>E.coli</u>
	<u>IS3</u>		<u>E.coli</u>
	<u>IS136</u>		<u>Agrobacterium tumefaciens</u>
2c	<u>IS30</u>		<u>E.coli</u>
	<u>IS4351</u>	<u>Tn4351</u>	<u>Bacteroides fragilis</u>
3	<u>Tn21</u>	<u>Tn4</u> <u>Tn501</u> <u>Tn1401</u> <u>Tn1721</u> <u>Tn2603</u> <u>Tn2607</u> <u>Tn2608</u> <u>Tn2613</u> <u>Tn4000</u>	<u>Enterobacterias</u>
	<u>Tn3</u>	<u>Tn1</u> <u>Tn2</u> <u>IS101</u> <u>Tn1720</u>	<u>Enterobacterias</u>
	<u>Tn917</u>	<u>Tn551</u>	<u>Streptococcus faecalis</u>
	<u>Tn7</u>		<u>Enterobacterias</u>
	<u>Tn554</u>	<u>¿IS21?</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>

a) Tomado de Syvanen 1988

Los sitios de inserción de los EM pueden ser elegidos de forma azarosa o específica. Existen ejemplos en ambos sentidos; hay transposones que exclusivamente se mueven a secuencias con cierta similitud con las secuencias de sus IR, así como transposones que no tienen ningún patrón de reconocimiento. El ejemplo más claro de ambas posibilidades es el Tn $\gamma$ . En el transposón Tn $\gamma$ , hay dos marcos de lectura que codifican para proteínas que modifican la actividad de la transposonasa en cuanto a la selección del sitio blanco. Estas dos proteínas dirigen la transposición hacia una secuencia consenso, ó hacia un punto azaroso. La regulación de la transcripción de estas dos proteínas determina el patrón de inserción del Tn $\gamma$ .

En relación a la selección de un sitio blanco, pueden proponerse varias posibilidades. Una, es que la transposonasa reconozca a una estructura específica de DNA. Esta estructura puede estar formada por un doblez natural, propio de la secuencia de DNA, o bien, uno generado por la unión al DNA de alguna proteína (similar a una histona). Otra posibilidad es que se seleccione una región, por la fuerza de unión entre sus cadenas (proporción de A-T). Por último, cabe la posibilidad de que una proteína involucrada en transposición, tenga afinidad por una secuencia específica de DNA (Galas y Chandler 1989, Galas et.al. 1980, Gamas et.al 1987, Meyer et.al 1980, y Stellwagen 1983).

#### **Mecanismos de transposición.**

La transposición de los EM posee algunas características compartidas, como la pequeña duplicación de la secuencia



receptora; sin embargo, el mecanismo de transposición solamente es claro para algunos elementos.

Básicamente existen dos modelos de transposición, uno replicativo, y otro conservativo, aunque se han postulado variaciones y combinaciones de estos modelos. El modelo replicativo, implica la replicación del elemento, ya sea antes o durante su transposición. Una de las herramientas más empleadas y en la cual se apoya este modelo, es la identificación de moléculas intermedias o cointegrados. Los cointegrados son moléculas formadas por 2 replicones unidos por dos secuencias repetidas, orientadas en forma idéntica. Las secuencias de inserción y los transposones comúnmente son las secuencias repetidas directas que unen dos replicones para formar un cointegrado. El modelo replicativo postula que sólo una de las moléculas porta originalmente una secuencia de inserción (donadora), y que como el cointegrado porta 2, éste representa un intermediario, producto de una transposición replicativa. Siempre que ambas moléculas involucradas sean replicones, la resolución del cointegrado genera 2 moléculas autónomas con una copia de la secuencia de inserción cada una.

En el caso de los transposones de la familia del Tn3, la formación de cointegrados es un paso intermedio en el proceso de transposición (ver Pág.15).

El elemento móvil IS21 en cambio, es un ejemplo en el que la transposición no replicativa genera cointegrados. Un transposón compuesto de 3pb flanqueadas por dos IS21, ó "IS21.2", genera cointegrados a una frecuencia especialmente alta ( $1 \times 10^{-3}$ ). Sus cointegrados, sin embargo, no poseen dos

copias del IS21.2, sino que unen a la molécula donadora y la receptora por dos copias de la IS21 exclusivamente.

Un aspecto que no considera este modelo, es que se pueden generar cointegrados por recombinación homóloga de moléculas con secuencias de inserción adquiridas en eventos de transposición independientes.

El modelo conservativo propone la "levitación" del elemento, el cual no deja una copia de si mismo en la molecula donadora ( Galas y Chandler 1989) . Cuando menos tres evidencias sugieren la existencia de este mecanismo. Los experimentos de transposición con heteroduplex de IS10::lac demostraron que los marcadores de ambas cadenas se encontraban en el nuevo sitio de inserción (Bender y Kleckner 1986). La segunda linea de evidencias proviene de rearrreglos intramoleculares complejos generados por transposones compuestos. En 1985 Isberg y Syvanen describieron un transposón de la familia del Tn5, que produjo eventos de inserción-inversión, los cuales se apegan a dicho modelo. Por ultimo, el descubrimiento de formas circulares del Tn10 que demuestran la ocurrencia de cortes de doble cadena en los extremos del Tn10 (Morisato y Kleckner 1984) y la comprobación de que esta circularización se lleva a cabo en sistemas in vitro en ausencia de síntesis de DNA (Morisato y Kleckner 1987).

El estudio de estos modelos se basa en el aislamiento de productos intermediarios o finales de transposición; sin embargo estos productos pueden ser modificados por mecanismos de recombinación. Además, moléculas similares a los productos de transposición pueden generarse por mecanismos diferentes a la transposición. Estas opciones dificultan la acreditación de los

productos finales e intermediarios de transposición.

En la mayoría de los casos estudiados, los resultados respecto al modelo de transposición empleado por los diferentes EM, prueban la utilización de uno de los modelos, pero no excluyen la utilización del otro modelo de transposición.

Es claro, que eventos como los cortes y uniones de DNA en las cadenas donadora y receptora, y cuando menos la replicación necesaria para reparar el corte asimétrico, pueden incluirse en cualquier esquema que pretenda explicar la transposición de un elemento.

A continuación se presentan los modelos de transposición mas aceptados para algunos transposones:

El bacteriofago Mu, es uno de los ejemplos mejor estudiados y del cual se dispone de evidencias experimentales sobre su mecanismo de transposición. Experimentos en los que se infectaron células deficientes en metilación con fagos completamente metilados; o células deficientes en recombinación, con fagos heteroduplex (generados por mutaciones en diferentes sitios en cada cadena, o marcando con diferentes isótopos radioactivos cada cadena) demostraron que el fago Mu puede transponerse sin replicarse. Este evento de transposición conservativa, se lleva a cabo despues de la infección con el fago, y no se sabe si durante las transposiciones posteriores, se pueda repetir este mecanismo. Sin embargo, durante la fase lítica del fago Mu, se llevan a cabo masivas transposiciones replicativas.

El Tn<sub>10</sub>, es un transposon compuesto, cuyas IS son las IS<sub>10</sub>. Solamente la IS<sub>10</sub> derecha es completamente funcional, y

suficiente para transponer todo el elemento. Experimentos en los cuales se analizaron los productos de transposición de Tn<sub>10</sub> heteroduplex, formados por marcadores diferentes para cada cadena tanto en las IS<sub>10</sub>, como en secuencias interiores del Tn, indicaron claramente que el Tn<sub>10</sub> (IS<sub>10</sub>), transpone principalmente por un mecanismo conservativo, no replicativo (Kleckner 1989).

El Tn<sub>3</sub> y los elementos de esta familia, transponen replicativamente. Se ha probado que la transposición intramolecular del Tn<sub>3</sub> ocurre en dos pasos secuenciales. El primer paso involucra la replicación específica del Tn<sub>3</sub>, y la fusión inicial entre las moléculas donadora y receptora, para formar al intermediario de transposición denominado cointegrado. El segundo paso es la recombinación sitio específica entre los dos Tn<sub>3</sub>, en el cual se resuelve el cointegrado, para generar los productos finales de transposición. La enzima que cataliza esta recombinación se denomina Resolvasa, y el gene que la codifica se encuentra en el propio Tn<sub>3</sub> (no todos los EM poseen resolvasa). (Sherrat 1989).

Existen evidencias que demuestran la transposición replicativa de cuando menos otras dos IS, IS<sub>903</sub> e IS<sub>102</sub>.

Estos argumentos indican que ambos modelos existen en la naturaleza, y que probablemente varios elementos utilicen ambos para transponer.

Uno de los EM más interesantes desde el punto de vista clínico es la secuencia de inserción IS<sub>1</sub>, ya que esta se encuentra presente en plásmidos multirresistentes, implicados en algunas epidemias de este siglo. Este estudio es una aproximación al comportamiento de la secuencia IS<sub>1</sub> y a su participación en el

origen y propagación de los plásmidos multirresistentes.

## IS<sub>1</sub>

### DESCUBRIMIENTO Y DISTRIBUCION

La Secuencia de Inserción 1 (IS<sub>1</sub>) es uno de los elementos móviles mas pequeños, tiene tan solo 768 pares de bases (pb). Fue Malamy, de comun acuerdo con Hirsh, quien en 1972 designó la nomenclatura de las Secuencias de Inserción, como IS, seguida de un numero itálico que las distinguiera. Los grupos de investigación de Malamy, de Hirsch, de Jordan, y el de Michelis fueron los principales pioneros en el campo de las secuencias de inserción bacterianas. Es difícil determinar cual de ellos encontró primero la secuencia de inserción IS<sub>1</sub>. Desde 1966 estos grupos iniciaron un análisis intensivo de las mutaciones generadas por estas secuencias. En 1968 Jordan demostró que dichas mutaciones se debian a la inserción de secuencias discretas de DNA. Michelis en 1969, probó que las inserciones de dos mutantes independientes, compartian secuencias que hibridaban. Para 1972, los grupos de Malamy y de Hirsch describieron las características de las secuencias de inserción; estas secuencias tenian varias copias dentro del cromosoma de sus portadores. De todas las mutantes que analizaron, solamente identificaron 3 secuencias de inserción diferentes, las cuales se identificaron en varios operones y en varias orientaciones; curiosamente ambos grupos trabajaban exactamente con las mismas secuencias de inserción.

La secuencia IS<sub>1</sub> se encuentra presente en el cromosoma de diferentes bacterias y como puede observarse en la Tabla 3, su

número varia inclusive dentro de la misma especie. En promedio se puede decir que E.coli posee 6 copias de IS<sub>1</sub> en su cromosoma (Galas y Chandler 1989). En 1989 Birkenbihl et.al publicó el mapeo completo de la localización de secuencias IS<sub>1</sub> en el cromosoma de E.coli. K-12. El origen de esta secuencia no es muy claro; sin embargo, Ohtsubo et.al. (1980) sugiere que éste no es muy remoto, ya que la comparación de las secuencias de diferentes iso-IS<sub>1</sub>'s, de E.coli y Shigella, muestran divergencias en secuencia, de un 1 a un 44%; sin embargo, apatemente todas las iso IS<sub>1</sub> conservan los marcos de lectura hasta ahora involucrados con su actividad.

TABLA 3.- DISTRIBUCION DE LA IS<sub>1</sub> EN DIFERENTES ORGANISMOS (a)

ORGANISMO	# COPIAS	ORGANISMO	# COPIAS
<u>E.coli</u> . K12		<u>S.typhimurium</u>	0
wt	6-8	<u>Shigella disenteriae</u>	40
Ymel	6	<u>sonnei</u>	30
EMG2	6	<u>boydii</u>	2
W1485	6-7	<u>flexneri</u>	40
W2252 HfrC	7	<u>Citrobacter freundii</u>	0
W2367	8	<u>Edwardsiella tarda</u>	0
W3110	7-9	<u>Enterobacter aerogenes</u>	0
JE5519	10	<u>Erwinia amylovora</u>	0
x101	6	<u>Klebiella aerogenes</u>	1
C600	8	<u>Serratia marcescens</u>	2
W6	4	<u>Rhizobium japonicum</u>	0
B	17	<u>Proteus mirabilis</u>	0
C	3	<u>Streptomyces niveus</u>	0
W	0		

a) Tomado de Galas y Chandler 1989

La IS<sub>1</sub> puede transponer dentro del genoma en el que se encuentra, lo que genera secuencias repetidas, pero además, al transponerse a plásmidos conjugativos y fagos, puede introducirse en diversas bacterias por conjugación o transducción.

## ESQUEMA GENERAL DE TRANSPOSICION

La IS<sub>1</sub> como las demas IS's, puede "moverse" de una secuencia a otra de DNA. Su inserción es considerada como azarosa (Read H.A. et.al.1980), a pesar de que se han detectado cuando menos dos sitios en los que su inserción es muy frecuente (HOT-SPOTS) uno en la región OP del operón Gal (la cual representa menos del 1% del operón) y otro en el plásmido pBR322. (Galas y Chandler 1989, Galas et.al.1980, Gamas et.al 1987, Meyer et.al 1980, y Stellwagen 1983).

La IS<sub>1</sub> también genera secuencias pequeñas repetidas directas en el sitio de inserción, como los demas elementos móviles; en su caso, repite normalmente 9pb, aunque se han identificado variantes que generan repetidas directas de 7 y hasta 14pb (Galas y Chandler 1989).

Normalmente, la IS<sub>1</sub> se duplica durante la transposición, de tal manera que se obtienen 2 IS<sub>1</sub> como resultado final de la transposición de una IS<sub>1</sub>.

### SECUENCIA DE LA IS<sub>1</sub>:

#### I.-SUS EXTREMOS Y SUS SITIOS cis.

La secuencia nucleotídica de la secuencia IS<sub>1</sub> ha sido determinada (Ohtsubo H. 1978, Johnsrud L. 1979). Posee terminales Repetidas Invertidas (IR) de 35 pares de bases (pb) repetidos casi perfectamente; estas IR's son denominadas insL e insR, izquierda y derecha respectivamente (Gamas et.al. 1985, Ohtsubo y Ohtsubo 1978, Grindley y Sherratt 1978, y Prentki et.al. 1987, Zerbib et.al. 1990). Las dos IR son esenciales para el reconoci-

miento del elemento por la transposasa antes de moverlo (Gammas et.al. 1985, Machida Y. et.al. 1982, y Prentki et.al. 1987).

Las IR's de la IS<sub>1</sub> son reconocidas cuando menos por tres proteínas; la RNA polimerasa (RNAPol), el Factor de Integración del Hospedero (IHF), y una proteína codificada por la misma IS<sub>1</sub>, la InSA. En caso de que la InSA, no sea la transposonasa, debe considerarse que también ésta reconoce los extremos de la IS<sub>1</sub>. Cualquiera de las IR'es funcional, y es reconocida por las tres proteínas. Al igual que la RNAPol, InSA e IHF protegen secuencias mucho mayores a las involucradas directamente con su unión al DNA. La secuencia esencial mínima requerida para la actividad de transposición de cualquiera de los extremos de la IS<sub>1</sub> son 24pb repetidos casi perfectamente. Los extremos de la IS<sub>1</sub> pueden dividirse funcionalmente en 3 dominios involucrados con la transposición:

El primero involucra sitios esenciales para la transposición, son en realidad los verdaderos extremos del elemento, las 3pb finales. Este dominio esencial para la transposición, no altera la afinidad de unión de proteínas a la IR.

En el segundo dominio, se unen las proteínas InSA, IHF y RNAPol. Su papel en la transposición es mucho más complejo. Los sitios de reconocimiento de las proteínas InSA e IHF se sobrelapan, sin embargo los dominios de unión en la secuencia de las IR's son diferentes. Se ha demostrado que mutaciones en ciertos sitios de las IR's alteran la afinidad de la proteína InSA, sin modificar la afinidad de la proteína IHF. Aparentemente cualquier mutación que afecte la unión de la proteína InSA, afecta también la transposición de forma severa. El papel de la proteína IHF es



más incierto. Algunas mutaciones que disminuyen su afinidad pero sin anularla (sin modificar la afinidad de unión de la InsA), pueden o no ser activas en transposición. Además, diferentes combinaciones en las que se modifican las afinidades de unión de ambas proteínas, en forma parcial o total, provocan una caída en la transposición (a excepción de la combinación InsA++, IHF+ en la que si se detecta transposición).

Los ensayos de retardo de DNA en los cuales se ha demostrado independientemente la unión de ambas proteínas, indican que la secuencia es doblada de forma especial al formar el complejo DNA-PROTEINA. Sin embargo, no se ha podido detectar la unión simultánea de ambas proteínas. Experimentos de retardo en los que se usaron extractos crudos de cepas IHF+ e IHF- para detectar la unión de la proteína InsA a 80pb que incluían 24pb de las IR's de IS1, no mostraron diferencias.

Esta región de unión de ambas proteínas, es parte del promotor reconocido por la RNAPol y corresponde a la región -35.

El tercer dominio, no es esencial para la transposición, o para la unión de las proteínas. La presencia de esta región en la insL acompañada de un extremo insR íntegro, estimula la transposición. En su ausencia, bajan la afinidad de IHF y la transposición, no dramáticamente, pero sí de forma reproducible.

En la Figura 1, se muestra la secuencia de los extremos de la IS1, los sitios indispensables para la transposición de la IS1, y cuales de estos, afectan la unión de algunas de las proteínas involucradas (Zerbib,et.al. 1987 y 1990, Galas y Chandler 1989, y Prentki et.al. 1987).

## SITIOS IMPORTANTES EN LA TRANSPOSICION DE IS1

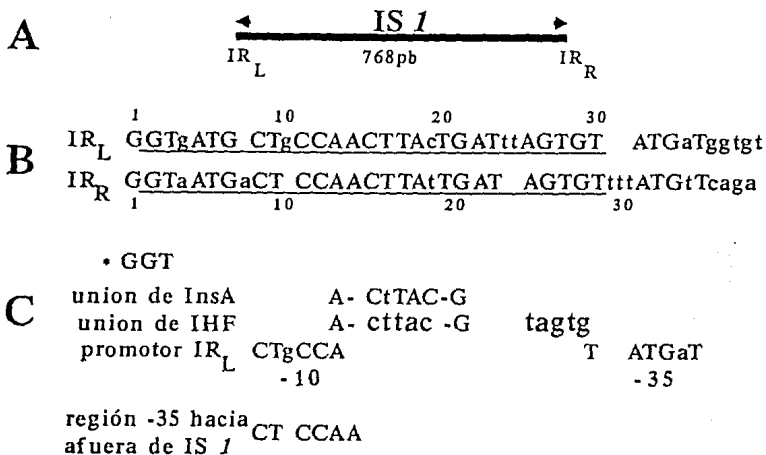


Figura.1.- A, esquema de la IS<sub>1</sub> (768pb), se indica la orientación de las IR's. B, secuencia de las IR's (subrayado), y las coordenadas de las mismas; las minúsculas corresponden a los sitios en los que no coinciden ambas IR's. C, sitios involucrados (minúsculas) y esenciales (mayúsculas) en la unión de las proteínas Insa, IHF y RNAPol. Con un \* se indican las 3pb finales del elemento en ambas IR's, esenciales para la transposición, pero no afectan la afinidad de las proteínas involucradas con la secuencia.

### II.-MARCOS DE LECTURA ABIERTOS, TRANSCRIPCION Y ACTIVIDAD.

La IS<sub>1</sub> posee un complicado esquema de transcripción. Como las secuencias de inserción IS<sub>2</sub>, IS<sub>4</sub>, IS<sub>5</sub>, e IS<sub>903</sub>, la IS<sub>1</sub> posee varios marcos de lectura abiertos (MLA), los cuales por el

tamaño del elemento, evidentemente están sobrelapados (Galas y Smith 1984, Machida et.al. 1984 a). Se conocen 8 MLA con capacidad para codificar para polipeptidos de 50 aminoácidos cuando menos; estos marcos han sido denominados como insA a insG e insB' (Machida et.al. 1984 a y Zerbib et.al. 1987).

La transcripción de estos MLA se lleva a cabo gracias a que las IR's de la IS<sub>1</sub> contienen promotores fuertes (Machida et.al. 1984 b). La RNA polimerasa se une a estos promotores (ins P<sub>L</sub>, izquierdo e ins P<sub>R</sub>, derecho) y cubre unas 70 pb. La unión de la RNAPol es más fuerte en el insP<sub>L</sub> que en el insP<sub>R</sub>. El transcrito del ins P<sub>L</sub> inicia en una de las 5 adeninas dentro de la insL y continúa hacia el interior de la IS<sub>1</sub>. La mayoría de los transcritos que genera, poseen 5 uridinas en sus extremos 5'. Los transcritos del insP<sub>R</sub> inician en una adenina, y siguen hacia el interior de la IS<sub>1</sub>, es decir en dirección opuesta al otro promotor. El insP<sub>L</sub> se usa para transcribir los MLA insA e insB, y posiblemente insB' los cuales están involucrados con la transposición de la IS<sub>1</sub> (Chan y Lebowitz 1982, Machida et.al. 1984 a, Zerbib et.al. 1987, Jakowec et.al. 1988).

En la Figura 2, se señalan los MLA de la IS<sub>1</sub>, las coordenadas en las que se ubican y su orientación.

Los ocho marcos de lectura abiertos se estudiaron introduciendo mutaciones ambar que exclusivamente afectan a un marco de lectura, y resultan neutrales para el marco de lectura sobrelapado (Jakowec et.al. 1988). Los resultados de este análisis nuevamente sugieren que los genes insA e insB son los únicos esenciales en la transposición de la IS<sub>1</sub>. Sin embargo, los

## MARCOS DE LECTURA ABIERTOS EN IS<sub>1</sub>

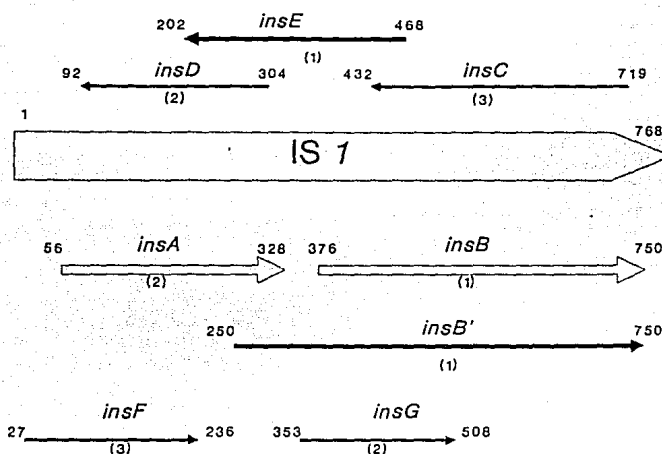


Figura 2.- Los posibles MLA capaces de codificar para péptidos de mas de 50aa. se muestran como flechas, en la orientación y coordenadas correspondientes. Entre parentesis se indica el marco de bases empleado para formar los codones (ejemplo: la secuencia CCATCG se puede emplear en los siguientes codones, 1.-CCA ICG, 2.-C CAT CG, y 3.- CC AIC G.)

marcos de lectura *insB'*, así como *insC*, *insD* e *insE*, de alguna forma son necesarios para el adecuado control de la transposición de la IS<sub>1</sub>.

Anteriormente se pensó que la transposasa de la IS<sub>1</sub> era exclusivamente Insa, aunque se proponía que el producto del gene insB podría participar tambien en la transposición. Los trabajos de Machida y Machida de 1987 indican que la transposonasa está codificada por los marcos de lectura insA e insB (*insA-insB*). Mutaciones en cualquiera de estos dos marcos de lectura, generan la duplicación de un número diferente de bases en el sitio de inserción. Esto sugiere que las proteínas Insa e InsB participan en la transposición, determinando el número de bases que se duplican en el sitio blanco. En 1989 Moser *et.al.* propuso que la

transposasa estaba codificada por el marco de lectura de insA, y parte de la secuencia de insB. Se propuso que un corrimiento en el marco de lectura de traducción podría eliminar el codon de terminación de insA, de manera que la traducción podría continuar a través del gene insB, y un nuevo marco de lectura se seguiría traduciendo a través del extremo 3' de insA, de la región intermedia y de insB. En 1989 Machida y Machida y en 1990 Lüthi et.al. presentaron evidencias que apoyan este modelo. Mutaciones de corrimiento del marco de lectura (frameshift), generadas añadiendo o eliminando 1 ó 2 pb en la región involucrada, eliminan la actividad de transposonasa.

Los trabajos de Machida, de Lüthi y de Jakowec utilizaron modelos de estudio similares: la detección de intermediarios de la transposición. Estos intermediarios son cointegrados formados por la transposición de una IS<sub>1</sub> de uno de los plásmidos (donador) a otro (receptor). Sin embargo, estos eventos pueden ser considerados como el resultado de eventos alternativos, como la recombinación mediada por la IS<sub>1</sub>. Un estudio realizado por Braedt en 1988 involucra no sólo a los genes insA e insB en eventos de recombinación mediados por IS<sub>1</sub>, sino que les adjudica un tipo de eventos de recombinación específico. El modelo empleado por Braedt consta de un plásmido con 2 IS<sub>1</sub> repetidas en la misma orientación, separando dos regiones de DNA provenientes de plásmidos diferentes, es decir, se trata de una estructura similar a un cointegrado. Con este sistema se detectaron dos tipos de eventos dependientes de funciones codificadas por la IS<sub>1</sub>. El primero involucra la delección de secuencias del plásmido precur-

sor, desde un extremo de la IS<sub>1</sub> hasta un sitio preciso, no azaroso en el plásmido. Este evento depende de los genes insA e insB. También detectó otro tipo de plásmidos recombinantes generados por las IS<sub>1</sub>. Este segundo evento, es la recombinación entre las dos IS<sub>1</sub> repetidas directas. Este evento, requiere un gene insC intacto, y no requiere de insA e insB. Estos resultados sugieren el posible papel de una resolvasa independiente de la transposonasa.

#### LAS PROTEINAS DE IS<sub>1</sub>.

Los diferentes MLA de la IS<sub>1</sub>, así como regiones que comprenden a varios MLA se han clonado en diferentes vehiculos moleculares. Estos vehiculos permiten la transcripción específica de las regiones de DNA clonadas. Con estos sistemas se ha detectado exclusivamente la transcripción y la traducción de una proteína, la InsA, de 9.8kd . En los demas marcos de lectura abiertos, no se detectó la expresión de ninguna proteína. En un principio se pensó que la transcripción de los posibles mensajeros de insB e insB' (que se encuentran codificados en la misma cadena y hacia el 3' respecto al transcrito de insA) estaba bloqueada por un terminador de la transcripción Rho dependiente que se encuentra entre los genes insA e insB. Sin embargo, se demostró que la transcripción por la RNA polimerasa de T7 atraviesa este terminador. Por lo anterior, se ha propuesto que los productos de estos genes son muy lábiles ( mRNA o proteína), o que se regulan a nivel de la traducción (Zerbib et.al. 1987).

## REGULACION

Aun cuando no se conoce bien el sistema de regulación de la IS<sub>1</sub>, se ha postulado que la Insa es un autorregulador de la transcripción de insa, y de la Transposasa (insa-insB). Para determinar el efecto de Insa o de otras proteínas codificadas por IS<sub>1</sub> en transposición, medida por la formación de cointegrados, se realizaron experimentos de sobre-producción de las proteínas codificadas por los diferentes marcos de lectura de IS<sub>1</sub>. Los resultados indican que una sobreexpresión de insa e insB, o exclusivamente de insa inhiben tanto la formación de cointegrados como la transposición. Sin embargo, al expresar moderadamente insa e insB, al igual que cuando se sobre-expresa insB, o en mutantes derivadas de insa, la formación de cointegrados y la transposición son normales (Machida y Machida 1989). En otra serie de experimentos se probó no sólo que Insa regula la transcripción de insa desde el insP<sub>L</sub>, sino que además puede ejercer su papel en trans (Zerbib et.al. 1990). Esta serie de experimentos incluyó la detección de cointegrados y la cuantificación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en fusiones de insa-lacZ bajo el control del insP<sub>L</sub> en presencia y en ausencia de una copia del gene insa entero insertado en lambda.

El papel de un inhibidor en trans codificado por la IS<sub>1</sub> también se ha reportado en otros sistemas, en los que se detectó inhibición de transposición y la actividad de una posible resolvasa de cointegrados (Braedt 1985,1988).

Mientras que las funciones inhibitorias de la transposición y recombinación mediadas por IS<sub>1</sub> aparentemente operan en

trans, se ha postulado, que las funciones de transposición y de recombinación codificadas por este elemento, operan en cis (Braedt 1988, Prentki et.al. 1987). Se sabe que la IS<sub>1</sub> puede complementar algunas de estas actividades en cis, estando en la misma molécula en la que se encuentra el elemento al que complementa (Prentki et.al. 1987).

#### FACTORES INDEPENDIENTES DE IS<sub>1</sub> QUE OPERAN SOBRE LA TRANSPOSICION DE ESTA SECUENCIA

En la transposición de la IS<sub>1</sub> participan tambien otras proteínas y factores como son la DNA polimerasa (DNAPol), las enzimas involucradas en la topología del DNA (Topoisomerasas), la proteína DnaA, el factor de terminación Rho, la transcripción a traves de la IS<sub>1</sub> y de los sitios blanco, y por último el Factor de Integración al Hospedero (IHF).

#### Rho

El factor de terminación Rho es importante para la transposición de la IS<sub>1</sub> y de otros elementos. La transposición de la IS<sub>1</sub> en cepas rho- es mucho menor que en las cepas silvestres isogénicas (Datta y Rosner 1987). Descifrar el efecto preciso de Rho sobre la transposición es difícil, ya que esta mutación es pleiotrópica. La disminución de la transposición en cepas rho- se puede deber a un desenrollamiento en el DNA, a la expresión diferente de los genes involucrados en la regulación de la transposición, o a un incremento en la transcripción de los sitios blanco sujetos a una regulación Rho-dependiente. Tal vez su papel sea la regulación de la expresión de los genes de IS<sub>1</sub> ya que se sabe de la existencia de un terminador Rho dependiente entre los



marcos de lectura insA e insB. Sin embargo, los reportes de Zerbib et.al 1987, Machida y Machida 1987 y 1989, Moser et .al. 1989, y Lúthi et.al. 1990, respecto a la transposonasa de IS1 (en los que se sugiere que la transposonasa esta compuesta por los MLA insA-insB) complican el sistema, ya que el terminador Rho dependiente, se localiza justamente entre los genes insA e insB, en medio de la transposonasa, y teóricamente, en su ausencia, se incrementaría la transcripción de la transposonasa, y por lo tanto, la transposición de la IS1. Evidentemente, el reporte de Datta y Rosner, es contrario al modelo teórico anterior. Es posible, sin embargo, que Rho participe en el corrimiento de fase de lectura que da lugar a la transposonasa, lo cual explicaría el requerimiento de Rho en la transposición. Otra característica de las cepas con esta mutación, es que pueden ser infectadas por el fago Mu, pero el ciclo replicativo del fago se ve disminuido (no afecta su transposición conservativa, sólo la replicativa).

#### DNAPol

Algunas mutaciones en la DNA polimerasa (DNAPol) también afectan la transposición. Aparentemente no son las actividades de polimerasa, ni de exonucleasa 5'-3', las involucradas en transposición. Pero si es claro, que su papel en la transposición comparte funciones con la reparación del daño a DNA por U.V. o metil etano sulfonato. Las mutaciones en polA que afectan la transposición replicativa de IS1, afectan la replicación del fago P1 de la misma forma que la mutación de rho a Mu; es decir, estas cepas pueden ser infectadas por P1, pero no puede generar una fase lítica, no puede replicarse independientemente. Estos resultados permiten suponer que tiene un papel en la replicación

especifica de ciertos elementos, independiente de la replicación del cromosoma, ya que revertantes que restauran la actividad de polimerasa no revierten el efecto sobre la transposición (Syvanen et.al. 1982, Chandler y Galas 1983).

#### TOPOISOMERASAS

La transposición de la IS<sub>1</sub> se ve afectada también por mutaciones en la DNA topoisomerasa I. No es claro si el requerimiento de superenrollamiento es en la IS<sub>1</sub>, o en el sitio blanco. Sin embargo, es claro que la topología del DNA en eventos de transposición y de recombinación es un factor clave. El equilibrio de actividades de los genes de la topoisomerasa I y de la girasa o topoisomerasa II (*gyrA* y *gyrB*), así como de factores externos que modifiquen estas actividades han sido estudiados tanto en IS<sub>1</sub> como en Tn5 (Sternglanz et.al. 1981, Isberg et.al. 1982, Garibay 1990). A pesar de que se involucra directamente la topología del DNA en la transposición, aun no pueden descartarse efectos secundarios de genes ajenos a la IS<sub>1</sub>, involucrados en la transposición, cuya expresión dependa del superenrollamiento.

#### DnaA

Una proteína que posiblemente también juega un papel importante en la transposición de la secuencia IS<sub>1</sub>, es DnaA. Esta proteína esencial está involucrada en el inicio de la replicación cromosomal. La IS<sub>1</sub> tiene dos sitios consenso de reconocimiento para esta proteína (coordenadas 396 y 547) y es posible que estos participen en la actividad de esta secuencia. En IS<sub>50</sub>, se ha demostrado que DnaA reconoce y se une a sus extremos, y que de

alguna forma participa en la actividad de estos extremos (Berg 1989).

#### IHF

El factor de integración del Hospedero (IHF) es una proteína básica relacionada estructuralmente con el grupo de proteínas similares a las histonas (Friedman 1988). Este grupo de proteínas se unen al DNA, cambian su estructura y generan complejos de topología específica. La IHF es el producto heterodimérico de los genes himA y himD (hip) de E.coli. La afinidad de la proteína IHF al DNA es específica, y depende de la secuencia de unión consenso Py-AANNNTTGAT-A/T. La unión de la IHF se ve afectada también por las secuencias que flanquean el sitio de unión; sin embargo, este efecto no ha sido identificado con precisión. El IHF se encuentra en una concentración estimada entre 14,000 y 20,000 dímeros por célula en crecimiento.

El IHF participa en muchos eventos genéticos (recombinación, replicación, reparto de plásmidos, transferencia, etc.); sin embargo, su participación en la mayoría de ellos se limita a facilitar la acción o unión de otras proteínas, gracias a la formación de estructuras secundarias complejas. Estas estructuras permiten la elección precisa de sitios en los diferentes eventos genéticos en los que participa la IHF (Echols 1986). A continuación se presentan algunos de los eventos genéticos en los que el factor IHF participa:

-Recombinación sitio específica. Su participación es esencial para que se lleve a cabo la integración del fago lambda al cromosoma (Sadowski, P. 1986), así como para la variación de fase "fimbrial" en E.coli (Dorman y Higgins 1987).

-Recombinación homóloga. Es posible que la IHF participe en la recombinación homóloga entre dos secuencias IS1 en los plásmidos FII. Dicho evento dependiente de RecA, ha sido ampliamente estudiado en diferentes enterobacterias, por su efecto en la multiresistencia de los plásmidos FII. Cuando la recombinación homóloga de las dos IS1 de un plásmido FII se resuelve generando dos moléculas, se dice que ha ocurrido una DISOCIACION, que es como se denomina este evento. En 1990 nuestro laboratorio exploró el papel de la IHF en la disociación de plasmidos FII. Los resultados obtenidos por A.Garibay sugieren que IHF bloquea la disociación.

-Regulación de la transcripción. Contribuye a la regulación de la transcripción del bacteriófago Mu. La unión de IHF a la región reguladora de Mu, induce la transcripción de los genes tempranos de Mu, o de su represor. La decisión entre estas dos opciones depende de la selección de unión, a uno de los dos sitios localizados en esta región (Krause y Higgins 1986). Además es esencial en la regulación de los genes ilv y xil de E.coli (Friedman et.al 1984) y del operón tra del plásmido F (Gamas et.al. 1987).

-Transposición. Se han detectado sitios consenso de unión de IHF en los EM IS10, IS50, IS1, en el Tn $\rho$ , y en Tn5 (Galas y Chandler 1989, Wiater, L.A. y Grindley, D.F. 1988, Berg, D.E. 1989). Sin embargo, el papel de la IHF en la transposición no ha sido identificado; es posible que a pesar de los múltiples sitios de unión detectados, estos no sean importantes en la transposición. Cuando menos en el caso del Tn5, se ha postulado, que su papel

sea indirecto, a través de la regulación de otros factores del hospedero involucrados en la transposición. El papel de IHF en la transposición de la secuencia IS1 no ha sido estudiado, pues el sistema experimental para detectar la transposición de IS1 depende de la conjugación de un plásmido, el pOX38, y el operón tra de dicho plásmido, no se expresa en ausencia de IHF.

-Replicación. Esta proteína es esencial para la replicación del plásmido pSC101, y del fago f1 (Gamas et.al. 1986, Greenstein et.al. 1988). El origen de replicación del plásmido F, posee sitios consenso de unión para la proteína IHF, la cual aparentemente juega un papel estructural en la función del oriT (Tsal et.al. 1990).

-Reparto. El IHF contribuye al proceso de reparto lisogenico del fago P1. La distribución adecuada de los fagos depende de la unión de la proteína ParB al sitio parS. La secuencia del sitio parS, está compuesta por dos dominios, uno pequeño (13pb) e independiente de IHF, y otro mayor, en el cual la unión de ParB se incrementa en presencia de IHF.

-Superenrollamiento. Finalmente, la modificación del superenrollamiento del DNA, es otro de los efectos de la proteína IHF. En cepas de E.coli himA- se estudió con topoisómeros de plásmidos multicopia, el efecto de IHF en el superenrollamiento, y los resultados sugieren que a pesar de su unión sitio específica al DNA, su ausencia tiene un efecto general sobre el superenrollamiento del DNA (Garibay 1990). Este efecto es indirecto ya que en estas mutantes, la expresión de la subunidad GyrA de la enzima girasa, se encuentra disminuida cuando menos 4 veces (Gellert et.al. 1983).

Como se mencionó en una sección anterior, la IS<sub>1</sub> posee dos sitios de unión para la IHF, los cuales están sobrelapados (pero no son los mismos) con los sitios de reconocimiento de la proteína InSA. Además, se detectó que un sitio preferencial para la inserción de IS<sub>1</sub>, es un sitio de unión de IHF (Gamas 1987). En este caso, como en el del Tn $\delta$ , no se sabe cuál es el papel de IHF, ya que puede estar involucrado en: a) la selección del sitio blanco; b) la estructura del complejo de transposición o del sitio blanco; c) la regulación de los genes codificados por el elemento móvil o por el cromosoma involucrados en la transposición; d) la generación de una topología general en la zona del evento y e) la atracción de enzimas involucradas.

Otros factores del hospedero cuya acción no está directamente involucrada con el evento de transposición, pueden interactuar con la IS<sub>1</sub>. Los sistemas de recombinación generales son un buen ejemplo, ya que estos pueden generar amplificaciones, inversiones e inclusive deleciones al recombinar a dos IS<sub>1</sub> próximas.

#### EFFECTOS GENERADOS POR LA IS<sub>1</sub>.

La IS<sub>1</sub>, como las demás secuencias de inserción, induce mutaciones en el genoma donde se localiza al interrumpir diversos genes, y alterar regiones vecinas. Esta secuencia genera frecuentemente deleciones (operon gal), fusión de replicones, inversiones y promueve eventos de recombinación homóloga (Saeidler et.al. 1980, Galas y Chandler 1989).

Determinar la aportación de la secuencia IS<sub>1</sub> en la

mutagenesis general de las bacterias es difícil, ya que éste es un proceso multifactorial. Sin embargo, se han realizado diversos estudios en torno a los efectos de la IS<sub>1</sub>.

La inserción de la IS<sub>1</sub> genera una fuerte polaridad en las secuencias corriente abajo respecto a la transcripción (Fiandt et.al. 1972, Hirsch et.al. a y b 1972). Esta polaridad se debe al efecto de una señal de terminación parcialmente dependiente de Rho, la cual ejerce su efecto en cualquier orientación. Este terminador, situado entre dos de los genes de la IS<sub>1</sub>, no funciona plenamente en cepas Rho- y cuando la transcripción se encuentra bajo el control del promotor P<sub>L</sub> de lambda y en presencia de la proteína antiterminadora N.

Ademas de la polaridad negativa, la inserción en cualquier orientación de la IS<sub>1</sub> puede modificar la expresión de un gene. En los extremos de las IR de la IS<sub>1</sub>, se encuentran cajas consenso de la región -35 de los promotores comunes de E.coli. Si una de estas cajas queda alineada con una de la región -10, entonces la inserción genera un promotor funcional para genes vecinos. Pero este no es el único mecanismo por el cual la IS<sub>1</sub> puede inducir la transcripción. Las señales presentes en esta secuencia, ademas de unir a la RNAPol., también unen a otros factores importantes para la transcripción, como las proteínas IHF y CRP. Al aumentar la cantidad de dichos factores en la región, se pueden modificar las condiciones de transcripción previas a la transposición de IS<sub>1</sub> en esta zona (Galas y Chandler 1989).

Un estudio sobre los efectos de la IS<sub>1</sub> en la mutagene-

sis bacteriana que excluye los efectos de un sitio preferencial de inserción de IS<sub>1</sub> en el gene lacI, indica que la IS<sub>1</sub> aporta el 4% de las mutaciones en ese gene. En el caso del gene galT, de 10 mutaciones polares analizadas, 10 fueron por inserciones de IS<sub>1</sub>. Por último, de 25 mutaciones espontáneas en el gene CI de lambda, 15 fueron causadas por IS<sub>1</sub>.

En cuanto a la aportación de la IS<sub>1</sub> en eventos de recombinación, se sabe que las copias de la secuencia IS<sub>1</sub> en un genoma, funcionan como sustratos de recombinación. La recombinación homóloga de secuencias IS<sub>1</sub> genera diferentes productos. La recombinación de copias repetidas directas de la IS<sub>1</sub> generan delecciones (operon gal) y amplificaciones (r-det plásmidos FII), mientras que la recombinación entre repetidas invertidas generan inversiones (Cornelis y Saedler 1980). La recombinación entre dos IS<sub>1</sub> de diferentes replicones, genera intercambios de secuencias entre replicones, o la fusión entre estos, dando lugar a "cointegrados".

Los cointegrados plasmídicos generados por recombinación de secuencias IS<sub>1</sub>, poseen dos secuencias IS<sub>1</sub> repetidas en la misma dirección, que unen por sus extremos a las moléculas originales. Esta estructura es similar a los cointegrados generados por la transposición replicativa de IS<sub>1</sub>; en los cuales la IS<sub>1</sub> en una de las moléculas originales, transpone hacia otra molécula, pero en estos últimos, la transposición de la IS<sub>1</sub> genera repetidas directas en el sitio de inserción. Esta transposición une en el proceso replicativo a las dos moléculas de DNA, las cuales se separan a través de un evento de recombinación intramolecular entre las dos IS<sub>1</sub>, dando origen a los productos finales de trans-



posición, con una IS<sub>1</sub> cada uno. Sin embargo, en ocasiones la resolución no se lleva a cabo, y el intermediario de la transposición "cointegrado" permanece estable. Este cointegrado, también tiene dos IS<sub>1</sub> repetidas en la misma dirección, que unen a las moléculas originales por sus extremos. En general los cointegrados generados por la secuencia IS<sub>1</sub> y los transposones compuestos por esta secuencia, son más estables que los generados por el Tn3. Otra característica importante de los cointegrados de IS<sub>1</sub> es que su frecuencia de formación es diferente a la de transposición, por lo que se ha postulado que en realidad no sean intermediarios de transposición, sino productos finales alternativos de una transposición directa (Chandler y Galas 1984).

Se ha postulado, que las deleciones de secuencias de DNA causadas por la IS<sub>1</sub>, son ocasionadas por eventos de transposición abortivos. Tanto en las deleciones del operón gal como en un sistema plasmídico (Greadt, B. 1985 y 1987), se ha demostrado que las deleciones originadas por IS<sub>1</sub> terminan en uno de los extremos de la IS<sub>1</sub>. En 1980 Calos, M *et. al.* propusieron que estas deleciones tenían por extremo opuesto a la IS<sub>1</sub>, una región preferencial de inserción para la propia IS<sub>1</sub>. Por lo anterior se ha sugerido que las deleciones son eventos abortivos de transposición, en los cuales una secuencia similar a la IR de la IS<sub>1</sub> es reconocida como si fuera IR (Galas y Chandler 1989).

#### ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL MODELO DE TRANSPOSICION

Reif y Arber (1980) sugirieron que la IS<sub>1</sub> transpone normalmente a través de un intermediario replicativo. El sistema de detección que emplearon consistió de una IS<sub>1</sub> a la cual se le

clonó el gene que confiere resistencia a kanamicina en el sitio PstI (interrumpiendo el marco de lectura insA). Los valores de transposición de esta IS<sub>1</sub> Kan<sup>r</sup> en cepas recA<sup>+</sup> fueron similares a los valores de formación de cointegrados en cepas recA<sup>-</sup>, en donde se detectaron valores de transposición mucho menores (dos ordenes de magnitud).

Por otra parte, existen evidencias de que la IS<sub>1</sub> transpone a frecuencias relativamente altas en algunos sistemas en los que no se detecta la fusión de replicones. Estos resultados sugieren que los cointegrados no necesariamente son intermediarios de la transposición de IS<sub>1</sub> (Galas y Chandler 1982).

A pesar de que la formación de cointegrados se relaciona con la transposición de la IS<sub>1</sub>, los intermediarios son detectados a altas frecuencias. Es decir, o la transposición se interrumpe en un paso intermedio a una frecuencia elevada, o los cointegrados son el producto de un evento diferente a la transposición. En el caso del Tn<sub>3</sub>, cuya transposición involucra la formación de cointegrados, estos no son detectados a menos que se afecten ciertas funciones del elemento necesarias para resolverlos (Sherratt 1989).

Los datos anteriores, indican que los cointegrados generados por la secuencia IS<sub>1</sub> son mucho más estables que los del Tn<sub>3</sub>.

Es importante señalar que la mayoría de los eventos generados por IS<sub>1</sub> se han analizado solamente en E.coli, empleando como herramienta fundamental de trabajo, plásmidos construidos por ingeniería genética y plásmidos naturales multirresistentes.

## PLASMIDOS

Ademas del cromosoma, es frecuente que las células de practicamente todos los géneros bacterianos contengan plásmidos, moléculas extracromosomales cuya replicación es independiente de la replicación cromosomal. El tipo de moléculas que forman este grupo es variado. Normalmente se trata de moléculas circulares covalentemente cerradas de doble cadena de DNA.

La información genética codificada por los plásmidos, es información accesoria para sus huéspedes, ya que su presencia no es imprescindible. En las bacterias, la información aportada por los plásmidos incluye la resistencia a agentes tóxicos como metales pesados y antibióticos, la utilización de fuentes alternativas de carbono, y la facultad de establecer relaciones simbióticas . Una importante aportación de los plásmidos, es la sexualidad de las bacterias. Los plásmidos conjugativos codifican información para transferirse de una bacteria a otra. Este evento, puede ocurrir entre diferentes especies y géneros, dependiendo del grado de independencia del plásmido respecto a sus posibles hospederos. Esta capacidad de introducirse en diferentes especies o géneros de bacterias es conocida como el **rango de hospederos** a los cuales tiene acceso un plásmido, y son característicos para cada uno de ellos. Esta propiedad permite el intercambio de información genética entre diferentes organismos, y somete a la misma información (plásmido) a diferentes ambientes de reparación, recombinación, restricción, etc. (Gómez 1983, Lewin 1985 y Novick 1987).

La información genética de los plásmidos, al no ser esencial, seguramente está sometida a una presión de selección

diferente de la que opera sobre la información cromosomal. En este sentido, los plásmidos pueden considerarse como un dominio genético diferente del cromosomal, formado por una poza de unidades de información en continuo proceso de ensamble, rearrreglo e intercambio. Además, gracias a su transferencia entre bacterias, se consideran como una poza informacional accesoria, común a distintas especies.

La presencia en los plásmidos de secuencias de DNA capaces de movilizarse de una molécula de DNA a otra (IS's y Tn's) así como la recombinación entre secuencias homólogas, son factores importantes en determinar la dinámica molecular de los plásmidos. La frecuencia de recombinación y de transposición, así como la estructura de las moléculas resultantes es diferente en cada bacteria. Sin embargo, una vez formado un plásmido con una nueva combinación de unidades de información, este plásmido puede ser transferido a otra bacteria donde puede sufrir nuevos rearrreglos moleculares (Gómez-Eichelman 1983, Martínez-Salazar 1986 y Martínez-Salazar y Gómez-Eichelman 1987).

En una misma bacteria pueden coexistir varios plásmidos. Para que esto suceda deben ser compatibles. Compatibles son aquellos plásmidos que no compiten por los mecanismos de segregación y/o replicación. Si se encuentran dos plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad dentro de una misma bacteria, estos se segregan de tal modo que cada bacteria retiene solamente a uno de los plásmidos (Scott 1984, Novick 1987 y Austin y Nordström 1990).

La secuencia de inserción IS1 se encuentra repetida en

plásmidos tipo F, y en los plásmidos multirresistentes (R). En una batería de 70 cepas clínicas multirresistentes de E.coli, Salmonella spp. y Shigella spp. se determinó que más del 50% poseen plásmidos portadores de la secuencia IS<sub>1</sub> (Ramirez et.al manuscrito en preparación) En otra batería de tamaño similar, de cepas naturales de E.coli obtenidas del hombre y de diferentes mamíferos, se encontro un 30% de bacterias portadoras de plásmidos con IS<sub>1</sub> (Sawyer et.al 1987).

Dentro de los plásmidos descritos en la literatura, los plásmidos R del grupo de incompatibilidad FII (pFII) son un grupo ampliamente estudiado. Son plásmidos conjugativos multirresistentes, que se presentan en una o dos copias por cromosoma hospedero, y tienen un tamaño aproximado de 100Kb (Womble y Rownd 1988, Couturier 1988, Novick 1987, Daves y Rownd 1972).

Estos plásmidos fueron descubiertos por su importancia clínica en epidemias causadas por bacterias patógenas multirresistentes a antibioticos a finales de los años 50's. Para la década de los 60's, Hedges y Datta, Watanabe, y Ohtsubo entre otros investigadores, reportaron las características de estos plásmidos, comparándolos con los plasmidos F, y con otros plásmidos R. En 1960 Nakaya et.al. reportó el aislamiento del plásmido NR1 (R100) de Shigella y demostró que era un factor que conferia multirresistencia a antibióticos, y que era transferible entre diferentes enterobacterias. La inestabilidad de estas moleculas en diferentes hospederos, fue una de las características mas sobresalientes. Watanabe reportó en 1963 que las resistencias conferidas por estos plásmidos a S.typhimurium se perdian a alta

frecuencia durante el crecimiento de dicha bacteria, y postuló desde entonces, que estos plásmidos estaban compuestos por dos unidades genéticamente distinguibles, un factor de transferencia (RTF), y una unidad con genes para la resistencias a antibioticos (r-det).

Los pFII (como el R1-19 y el R100), están formados por dos regiones funcionalmente distintas: a) El RTF, que contiene la información genética para la transferencia y para la replicación del plásmido y b) el r-det, que contiene la mayoría de los genes de resistencia a antibioticos presentes en estos plásmidos. El r-det esta flanqueado por dos secuencias de inserción IS1 orientadas en la misma dirección. La mayoría de los genes de resistencia del r-det estan formando parte de transposones.

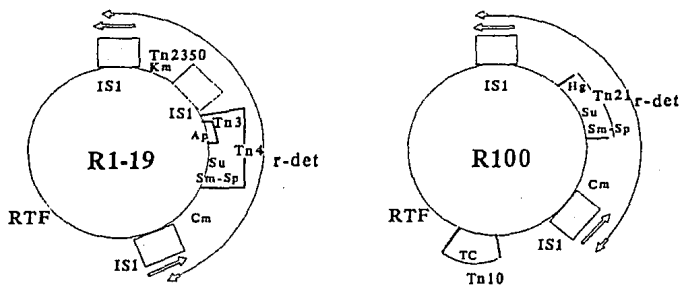


Figura 3.- Esquema de los pFII R100 y R1-19

La estabilidad de ambas regiones otorga una dinámica muy especial a los plásmidos FII, ya que estas moléculas pueden sufrir varios rearrreglos, en los cuales se duplican, multiplican

y separan el RTF y el r-det. Uno de ellos, es la **DISOCIACION**, evento de recombinación homóloga dependiente de RecA, entre las dos **IS<sub>1</sub>** que flanquean el r-det de los pFII, lo que genera dos moléculas separadas (**RTF::IS<sub>1</sub>** y **r-det::IS<sub>1</sub>**). La disociación de ambas moléculas ocasiona la pérdida de resistencia a los antibióticos para los cuales codifica el r-det, a menos que éste, se una nuevamente a un replicón, ya que no es capaz de replicarse autónomamente. Sin embargo, estas moléculas podrían recombinar con otros plásmidos que contengan también secuencias homólogas (**IS<sub>1</sub>** por ejemplo), lo que permitiría la dispersión de los determinantes de resistencia a antibióticos hacia nuevos hospederos, con diferentes sistemas de recombinación.

### DISOCIACION

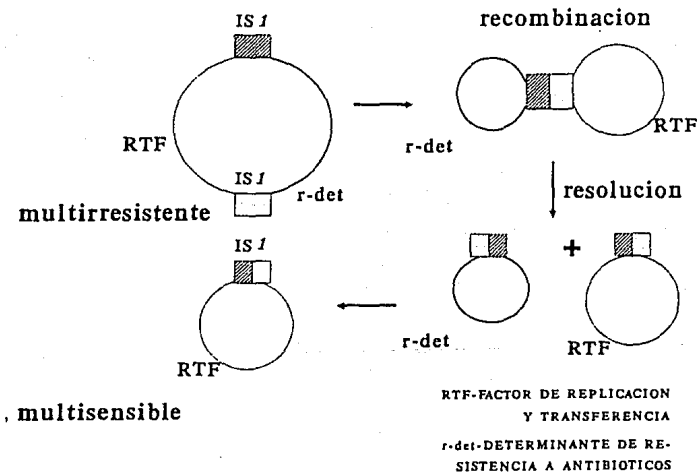


Figura 4.- Esquema de la disociación de un pFII multiresistente, que pierde la región que codifica para las resistencias a antibióticos.

Cuando cepas de *P.mirabilis* con el plásmido NR1 se crecen en presencia de altas concentraciones del antibiótico Cloramfenicol, se seleccionan células que tienen el plásmido NR1 con el r-det en multicopia, ya sea como una molécula independiente, o unida al RTF. Se ha postulado que la amplificación de la región r-det del NR1 es un evento molecular generado por la recombinación de secuencias homólogas; en este caso, las IS1 que flanquean al r-det (Rownd y Mickel 1971, Peterson y Rownd 1983).

En *E.coli* y en *S.sonnei* el r-det y el RTF, se mantienen establemente unidos; sin embargo se pueden detectar eventos de amplificación o disociación a muy bajas frecuencias.

En *S.typhimurium* los pFII se disocian frecuentemente, por una recombinación entre las dos IS1 (Chandler *et.al.* 1977, Gómez-Eichelmann 1983, Martinez 1986, Davies y Rownd 1972, Datta Y Hedges 1971a y b).

En *S.typhimurium* la recombinación y transposición de las IS1 es mas elevada que en *E.coli* a pesar de que los niveles generales de recombinación homóloga son similares en ambas bacterias. (Torres y Gomez-Eichelman 1983, Bustos-Martinez y Gómez-Eichelmann 1987). La recombinación de las IS1 en la disociación de los pFII depende del gene *recA* en *S.typhimurium* y en *E.coli*. En la primera bacteria se ha reportado la existencia del gene dor, en la ausencia del cual, los valores de disociación disminuyen dos ordenes de magnitud (Watanabe *et.al* 1980 y 1982). El "sistema" dor no ha sido bien caracterizado; sin embargo, se cree que está involucrado en la recombinación homóloga de secuencias específicas como la IS1 y de algunas otras, y se ha sugerido que



no participa en la recombinación homóloga general. En S.typhimurium es posible que la región r-det funcione como unidad de información genética intercambiable, a una frecuencia mucho mayor que en bacterias como E.coli.

El número de componentes involucrados en la disociación de los plásmidos FII y su papel, aun no es claro. Se ignora si las IS1 funcionan exclusivamente como sustratos de recombinación homóloga, o si aportan sitios o enzimas específicas.

Respecto al posible papel del RTF en la disociación de los pFII, no se sabe si es simplemente un portador del r-det, o si esta directamente involucrado con la disociación. Cuando menos dos trabajos permiten suponer que el RTF aporta información que modifica la frecuencia de eventos de recombinación: I.- Chernin y Ovadis (1980) sugirieron que una exonucleasa dependiente de ATP codificada por el RTF del R1-19 modifica la frecuencia de recombinación postconjugacional en diferentes mutantes de E.coli. II.- Chandler et.al. 1980 y 1982, reportaron el estudio de un plásmido derivado del R100, capaz de generar CCC r-det y plásmidos formados por un RTF y varias copias de r-det a altas frecuencias en E.coli; el comportamiento anormal de este derivado, es suprimido in trans por un plásmido silvestre. Este estudio involucra directamente a una región del RTF proxima al Tn10 con la inhibición de la disociación en E.coli.

El estudio de la dinámica molecular de los plásmidos FII permite profundizar en el conocimiento de su origen y comportamiento, así como sobre algunas funciones bacterianas utilizadas por los plásmidos, los elementos móviles y por las mismas bacte-

rias, en los mecanismos de recombinación que participan en los diferentes rearrreglos moleculares.

Los plásmidos FII en especial, poseen una estructura molecular que los convierte en un excelente modelo experimental para el estudio de los mecanismos moleculares de ensamble, disociación e intercambio de unidades de información entre los plásmidos, y para el estudio comparativo de estos mecanismos en diferentes bacterias. Particularmente se han empleado como modelo de eventos de recombinación generados por la IS<sub>1</sub>, ya que su estructura es muy similar a la de los cointegrados generados por la transposición de la IS<sub>1</sub> (Watanabe et.al 1980 y 1982, Gómez-Eichelmann y Torres 1983, Bustos-Martínez y Gómez-Eichelmann 1987, Martínez-Salazar y Gómez-Eichelmann 1987, Cruz y Gómez-Eichelmann 1984, Chandler et.al 1977).

En la Tabla 4 se enlistan las diferencias esenciales respecto a la disociación de los plásmidos FII entre las bacterias E.coli y S.typhimurium con el propósito de resumir y resaltar los principales argumentos expuestos en la Introducción. En la Tabla 5, se presentan los valores de disociación de pFII en E.coli y S.typhimurium.

TABLA 4.-DIFERENCIAS ENTRE *S.typhimurium* Y  
*E.coli* INVOLUCRADAS EN LA DISOCIACION DE pFII

CARACTERISTICAS	E.coli	S.typhimurium
Frecuencia de Disociacion	baja	alta
IS1 Cromosomal	8 copias	0 copias
Union de Proteinas	IHF,Ins A	?
Mutaciones Involucradas	Him A-	Dor-

TABLA 5.- FRECUENCIA RELATIVA DE DISOCIACION DE pFII EN DIFERENTES MUTANTES EN *E.coli* Y *S.typhimurium*

CEPA	FRECUENCIA RELATIVA
<i>E.coli</i> wt	0.01 - 0.05
recA-	<0.01
himA-	0.3
dam-	0.3
<i>S.typhimurium</i> wt	1
recA-	<0.01
dor-	<0.01

Recopilación de los trabajos de Gómez-Eichelmann y Torres H.K. 1983, y de Watanabe, Mise y Hashimoto. 1982.

## OBJETIVOS

Este trabajo tiene por objetivo general, comprender el evento de disociación, y el comportamiento diferencial de los pFII en S.typhimurium y en E.coli y como objetivo particular, la identificación y estudio de los factores involucrados en la recombinación mediada por IS<sub>1</sub>, que genera la disociación de los pFII. Para abordar estos objetivos, se plantearon tres hipótesis:

I.- El RTF de los pFII participa activamente en la disociación. La expresión de las funciones involucradas en este evento es diferente en los diferentes hospederos de estos plásmidos.

II.- La IS<sub>1</sub> codifica para factores que actúan en trans en la disociación de los pFII; estos factores pueden ser represores o inductores.

III.- Los pFII responden a funciones cromosomales que varían de hospedero a hospedero, dentro de estas funciones, probablemente se incluyan a IHF y a *dir*.

## MATERIAL Y METODOS

### MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 110°C y 15 libras de presión durante 25 minutos. Las soluciones de antibióticos se esterilizaron por medio de filtrado (filtros Millipore HA 0.25). Los medios de cultivo con agar se vaciaron calientes en las cajas de Petri (20 ml/caja) y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

#### Medio Luria (LB)

Bacto triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g
Timina	0.002 g
NaOH 2.5M	1.0 ml
H <sub>2</sub> O	1 Lt

#### Placas de Agar (L1)

Bacto agar	20 g
Medio LB	1 Lt

#### Medio Luria-Maltosa

Maltosa 20%	1 ml
Medio LB	100 ml

#### Placas con Antibiótico

Cuando se usó algún antibiótico en las placas de agar, éste se agregó después de esterilizar el medio, a las siguientes

##### concentraciones:

ampicilina (Ap)	[200 µg/ml]
cloramfenicol (Cm)	[ 25 µg/ml]
espectinomicina (Sp)	[ 25 µg/ml]
estreptomicina (Sp)	[ 50 µg/ml] y [200 µg/ml]
kanamicina (Km)	[ 25 µg/ml] y [ 50 µg/ml]
ácido nalidixico (Nal)	[ 20 µg/ml]
tetraciclina (Tc)	[ 25 µg/ml]

#### Agar Blando

Bactoagar	7 g
NaCl	8 g
Medio LB	30 ml
H <sub>2</sub> O	1 Lt

#### Medio de Dilución (MD)

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2.5 g
H <sub>2</sub> O	1 Lt

#### Medio McConkey

50 g de Medio McConkey / Lt de H<sub>2</sub>O

#### Placas de medio mínimo (M1)

NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
KPO <sub>4</sub>	3.0 g
NaPO <sub>4</sub>	6.0 g
NaCl	0.5 g
Bactoagar	20.0 g
Dextrosa 20%	10.0 ml
MgSO <sub>4</sub> 25%	1.0 ml
Vitamina B <sub>1</sub> 0.1%	0.16 ml

#### Medio Fry

Extracto de carne	10 g
Bactopeptona	5 g
NaCl	10 g
Bactoagar	14 g
H <sub>2</sub> O	1 Lt

#### Medio Luria Calcio

CaCl <sub>2</sub> 0.25 M	5 ml
Dextrosa 20%	5 ml
Medio LB	500 ml

#### Medio TSS 2X

Polietilenglicol 8000	20%
Dimetilsulfoxido	10%
Cloruro de Magnesio	50 Mm
Medio LB	
pH final:	6.5

Medio para almacenar cepas en micro-aerofilia (STAB, 2 ml de medio por tubo de 4 ml.)

Bacto caldo nutritivo	1.0 g
NaCl	0.8 g
Bactoagar	0.6 g
Triptofano 20 mg/ml	0.1 ml
H <sub>2</sub> O	100 ml

## Medio de Dilución para fagos (SM)

NaCl	1.16 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.4 g
Tris-HCl [pH 7.5]	10.0 ml
Gelatina	0.02 g
H <sub>2</sub> O	200 ml

## TBE

Tris-HCl [pH 8.3]	90 mM
Borato	90 mM
EDTA	10 mM
H <sub>2</sub> O	

## COLORANTE DE FICOLL

Azul de bromofenol	0.25 %
Xilen-cianol	0.25 %
Ficoll	15 %

## CEPAS BACTERIANAS, PLASMIDOS Y FAGOS

Las cepas bacterianas, plásmidos y fagos utilizados en el presente trabajo se enlistan a continuación.

CEPA	CARACTERISTICAS	FUENTE
<i>Escherichia coli</i>		
K37	Protótrofa Lac <sup>+</sup> HimA <sup>+</sup> Sm <sup>r</sup> .	H.Miller
K1299	Protótrofa Lac <sup>+</sup> $\Delta$ himA Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	idem
C600	thr leu thi F <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup>	C.Gómez E.
W3110	Protrótrofa F <sup>-</sup> Lac <sup>+</sup>	M.G.Marinus
182	Protrótrofa F <sup>-</sup>	J.Ramirez
JK85	gli A his S arg H thi 1 F <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup>	J.Parker
S17-1	pro thi Tra <sup>+</sup> (RP4-2 integrado) rec A	J.Martínez
MX614	$\Delta$ (pro-lac) gal E ilv thi Lac <sup>-</sup> Wal <sup>r</sup>	F.Bastarrachea
MX881	$\Delta$ (pro-lac) gal E ilv thi Lac <sup>-</sup> Wal <sup>r</sup> Rec A <sup>-</sup>	idem
<i>Salmonella thiphymurium</i>		
SU696	Auxótrofa Lac <sup>-</sup> Wal <sup>r</sup>	G.Alfaro
SU896	Auxótrofa Lac <sup>-</sup> Wal <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> recA <sup>-</sup>	J.Bustos
Hw205	ser A thy Lac <sup>-</sup>	Watanabe
Hw204	ser A thy Lac <sup>-</sup> dor <sup>-</sup>	Watanabe
Hw211	ser A thy Lac <sup>-</sup> rec A	Watanabe

PLASMIDO	CARACTERISTICAS	FUENTE
R1-19	Ap <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> -Sp <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	G. Alfaro
R100	Sm <sup>r</sup> -Sp <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	G. Alfaro
R100t	Sm <sup>r</sup> -Sp <sup>r</sup> Su <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	J. Martínez
RTF-2	Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	J. Martínez
pMS01	Ap <sup>r</sup> y Tc <sup>S</sup> derivado de pBR322	J. Martínez
pBX404-7	Tc <sup>r</sup> y con un gen inactivo para Km <sup>r</sup>	idem
pBR322	Am <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	F. Bolívar
pBR322::IS1	Am <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	M. Chandler
F'lac	lacy1	A. J. Clark vía F. Bastarrachea

FAGO	CARACTERISTICAS	FUENTE
LAMBDA $\lambda$ 434 cII <sub>68</sub>	Lítico en cepas IHF+ e IHF-	G. Guarneros
LAMBDA $\lambda$ 434 cin cII <sub>68</sub>	Lisogénico en cepas IHF+ Lítico en cepas IHF-	idem
R17	Lítico en cepas Hfr ó F+	G. Alfaro
P1ts Cm <sup>r</sup>	Lisogénico a 30°C, Lítico a 42°C, Cm <sup>r</sup>	F. Bastarrachea

# METODOS DE GENETICA BACTERIANA

## CULTIVOS BACTERIANOS

Los cultivos bacterianos se hicieron siempre a partir de un precultivo fresco. Este precultivo se preparó inoculando la cepa en un tubo con 3 ml de medio Luria (LB) el cual se incubó sin agitación a 37°C de 12 a 18 hrs.

Los cultivos bacterianos se hicieron en general inoculando una alícuota del precultivo en LB en una proporción de 1:100. Para ello se utilizaron matraces nefelométricos (con brazo lateral) de 125 ml, con 50 ml de cultivo. Se incubó con agitación constante a 100 rpm a 37°C, hasta alcanzar la densidad celular requerida.

La densidad celular del cultivo bacteriano se calculó por medio de la lectura periódica de su densidad óptica a 550 nm (DO<sub>550nm</sub>) en un espectrofotómetro. La lectura se realizó en el matraz nefelométrico ó en tubos de ensayo de 8 ml.

## CONSERVACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS

La conservación de las bacterias por períodos largos, se llevó a cabo en condiciones de microaerofilia. A partir de un cultivo en medio sólido, una muestra del césped bacteriano se sembró por piqueta en un tubo (STAB) el cual se tapó y selló con parafina. Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente en la oscuridad.

## PROPAGACION DEL FAGO P1Cm<sup>R</sup>S

Se preparó un cultivo (1:40 precultivo) a 30°C con agitación (200rpm) de la cepa lisógena en Luria con MgSO<sub>4</sub> a una concentración de 10mM para E.coli y de 100mM para S.typhimurium., al alcanzar una D.O.<sub>550nm</sub> de 0.3, se concentró 5 veces el cultivo en el mismo medio, y se incubó con agitación (200rpm) a 42°C por 2 hrs. Durante este período se detecta la lisis de las bacterias lisógenas. Posteriormente se incubó a 37°C por 90's, se añade cloroformo (1:20) y se agita (vortex). Se centrifuga y se recupera el sobrenadante decantando, y se añaden 2 gotitas de cloroformo.

## TITULACION DEL FAGO P1

La titulación del fago P1 se realizó empleando la cepa sensible AB1157. De un precultivo estacionario se inoculó 1:40 en medio Luria y se incubó a 37°C con agitación (200rpm) hasta alcanzar una D.O.<sub>550nm</sub> de 0.3. Se concentró el cultivo 10 veces y se emplearon 100ul de este por cada muestra, la cual incluye además de las bacterias concentradas, 50ul de CaCl<sub>2</sub> 15mM, 50ul de MgSO<sub>4</sub> 30mM y 100ul de lisado fágico en distintas concentraciones (1 x 10<sup>-5</sup>, -6 y -7). A cada muestra se le añadieron 2.5ml de agar blando líquido, y templado, se mezcló y se sembró por vaciado en cajas de Luria calcio, las cuales se incuban a 42°C por 12-24hrs.

## LISOGENIA

Para hacer lisógena de P1 Cm<sup>R</sup>S a las cepas descritas en este trabajo, se siguió la siguiente metodología:

Sembrar 200ul de un cultivo fresco en fase estacionaria de la cepa a lisogenizar en una caja de agar Luria con Cm, dejar que seque y añadir en el centro, 50-100ul del fago a un título de 20-1. Dejar la caja a 30°C por la noche y chequear en las colonias resistentes, tanto sus marcadores, como los conferidos por el P1.

## TRANSDUCCION

La transducción con P1 se realizó según el método descrito por Willetts, M. (1969), con algunas modificaciones. Se inoculó 1:40 un cultivo de Luria con un precultivo en fase estacionaria de la cepa deseada. La cepa bacteriana se dejó crecer hasta una D.O.<sub>550nm</sub> de 0.3, el cultivo se centrifugó y se concentró 10 veces respecto al vol. original. A 500ul del cultivo concentrado se le añadieron 250ul de CaCl<sub>2</sub> 15mM, 250ul de MgSO<sub>4</sub> 30mM y 500ul de lisado fágico titulado y diluido en proporción adecuada para tener la proporción de infección de un fago por 20 bacterias. En los controles de infección se sustituyó el fago por medio de Luria. Se mezcló suavemente y se incubó por 20'a 37°C sin agitación; posteriormente se centrifugó la mezcla, y se lavó 2 veces en MD. Finalmente se resuspendió en 100ul de MD y se sembró en cajas con medios selectivos.



El método utilizado normalmente está basado en Miller (1972), y se realizó de la siguiente manera:

Se prepararon cultivos de las cepas donadora y receptora en LB hasta alcanzar una  $DO_{550nm} = 0.2$  (Fase de crecimiento exponencial, aproximadamente  $5 \times 10^7$  células viables/ml). Se mezcló 1 ml de cada cepa en un tubo de ensayo y se incubó a  $37^\circ C$  sin agitación durante 1 hora.

Para conjugar plásmidos de las bacterias *E.coli* a *S.typhimurium* y viceversa, se sembraron precultivos solidos en cajas de LB agar, de las cuales se tomaron las conjungantes frescas, y se sembraron nuevamente en LB agar, pero una encima de la otra, y se incubaron sin agitación por 12hrs.

Las bacterias exconjugantes se seleccionaron en medio sólido con los antibióticos adecuados. Los antibióticos se seleccionaron de acuerdo con el fenotipo esperado para las exconjugantes.

Cuando se necesitó seleccionar a las bacterias exconjugantes en ampicilina, se hicieron diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en MD, con el fin de obtener un número menor de bacterias/ml. Esto se hizo debido a que el mecanismo de resistencia de las células exconjugantes se da a través de la producción de la enzima  $\beta$ -lactamasa. Esta enzima es muy eficiente para degradar a la Ap que se encuentra en el medio, alrededor de la célula. Es por ello que si la densidad celular es alta, las bacterias sensibles que estén alrededor de una resistente pueden crecer, lo cual dificulta la selección de las exconjugantes.

Se sembraron por espatulado 100  $\mu$ l del cultivo sin diluir en una placa de medio con el antibiótico. Lo mismo se hizo con los cultivos diluidos, en el caso de selección en ampicilina. Las placas se incubaron a  $37^\circ C$  de 14 a 18 hrs. Se eligieron algunas colonias exconjugantes al azar y se verificó su fenotipo en los antibióticos adecuados. Las exconjugantes de medio sólido, se seleccionaron estrizando varias asadas de la conjugación en las cajas de selección pertinentes.

Para determinar el número de bacterias viables por ml de cultivo bacteriano se utilizó la metodología propuesta por Miller (1972), descrita a continuación:

se determinó la  $DO_{550nm}$  del cultivo bacteriano a analizar, el cual se diluyó en MD. Las diluciones adecuadas para obtener colonias aisladas fueron: a una  $DO_{550nm}$  entre 0.2 y 0.4,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , y a  $DO_{550nm}$  entre 0.5 y 1.0,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . Se sembraron en L1, 100  $\mu$ l de cada dilución por espatulado con una varilla de vidrio en forma de L. Las placas se incubaron a  $37^\circ C$  de 14 a 18 hrs. con el fin de obtener colonias aisladas. Apartir de una célula viable se forma una colonia bacteriana. Para calcular las cuentas viables se contaron las colonias en las placas de la dilución donde crecieron entre 50 y 500 colonias aisladas. El número de células viables / ml de cultivo se calculó con la siguiente fórmula:  
Células/ml =

Número de colonias por placa  $\times 10 \times$  Factor de dilución

#### TRANSFORMACION BACTERIANA

Se utilizó el metodo descrito por Miller et.al 1989, el cual se describe a continuación:

A partir de un precultivo fresco, inocular (1:100) 10 ml de LB con la cepa a transformar, incubar a  $37^\circ C$  con agitación (200rpm) hasta llegar a una  $DO_{550nm} = 0.3-0.4$ . Al llegar a esa  $DO$ , se diluyen 1:1 con medio TSS 2X y se toman 100 ml de cultivo por cada transformación, y 100ml más como control, los cuales se transfieren a tubos preenfriados, se añade el DNA a transformar en volúmenes no mayores de 5 $\mu$ l, y en concentraciones desde 100pg hasta 1 $\mu$ g, y se agita la mezcla. Se mantienen en hielo los tubos por 30 min. Posteriormente se someten a  $43^\circ C$  por 5', y se regresan 5' al hielo. Se añaden 900ml de LB dextrosa, y se incuban en agitación a  $37^\circ C$  por 3hrs. Para seleccionar las bacterias transformantes, se concentra el cultivo centrifugando y tirando el sobrenadante, y se resuspende en 100ul de MD, del cual se siembran en cajas de LB agar con los antibióticos requeridos, diferentes cantidades e inclusive diluciones de la mezcla de transformación. Las cajas se incuban a  $37^\circ C$  por 12-18hrs.

El fago R17 es específico para bacterias F+ y Hfr. Este hecho se debe a que el receptor para este fago es el pilus formado por la proteína pilina. El gen que codifica para esta proteína es parte del operón tra, presente en los plásmidos F. Por lo tanto las bacterias que poseen un plásmido F sintetizan estos pili y son sensibles a este fago.

Con el fin de determinar si una cepa era F+ ó Hfr, se probó su sensibilidad a este fago. Para ello se hizo un cultivo de la cepa y de una cepa control Hfr en LB, hasta una  $DO_{550nm} = 0.6$ . Se sembraron 100  $\mu$ l de éste en una caja de medio Fry y se incubó bajo la flama de un mechero hasta que se secó el inóculo. Una vez seco, se colocaron 20  $\mu$ l de dilución del fago R17 en el centro de la zona del inóculo bacteriano y también se dejó secar. Se incubó a 37°C hasta que se observó la placa de lisis en el control (aproximadamente 14 hrs.)

#### TITULACION DEL FAGO LAMBDA

Se titularon dos cepas del bacteriófago lambda:  $i434cII_{68}$  e  $i434cin_{68}$  usando la siguiente metodología:

Se hizo un cultivo de bacterias lambda sensibles en LB adicionado con 0.2% de maltosa y se incubó por 14 hrs. hasta llegar a la fase de crecimiento estacionaria. 10 ml de este cultivo se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min. a 5°C y la pastilla se resuspendió en 10 ml de MD. Se volvió a centrifugar y se resuspendió en 0.4 del volumen original. Se almacenó a 4°C.

Se hicieron diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de cada muestra de fago en SM y se mezcló 0.1 ml de cada dilución con 0.1 ml del cultivo bacteriano. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 20 min., transcurridos los cuales se mezcló con 2 ml de agar blando fundido a 45°C y se sembró en L1. Se incubó a 37°C de 12 a 16 hrs., hasta observar la aparición de placas de lisis en el césped bacteriano. Cada fago activo produce una placa, por lo tanto el número de unidades formadoras de placa (UFP) / ml se calculó con la siguiente fórmula:

$$UFP / ml = \text{Número de placas} \times 10 \times \text{factor de dilución}$$

Con el fin de analizar el fenotipo HIMA- en la cepa K1299 de una manera indirecta, se utilizaron dos mutantes del fago lambda, las cuales inducen un grado de lisis diferente en las cepas IHF e IHF- (hima- ó himD/hip-). La metodología utilizada fué la siguiente:

Se preparó un cultivo de la cepa IHF-, así como de un control IHF+ en medio Luria-Maltosa, hasta llegar a una  $DO_{550nm} = 0.6$ . Se sembraron 100  $\mu$ l de este cultivo en placas de L1 y se dejó secar. Se colocaron 20  $\mu$ l de la dilución  $10^{-2}$  de cada cepa del fago lambda sobre la zona seca del inóculo bacteriano y se dejó secar. Se incubó a 37°C hasta observar lisis en el control (aproximadamente 18 hrs.).

Además del método anterior, también se empleó el descrito por Friden, P. et al. en 1984, el cual consiste simplemente en sembrar la cepa en cuestión en 3 medios mínimos, con el medio mínimo requerido por la cepa pertinente, otro con leucina, y finalmente uno con leucina, isoleucina y valina. Esta colección de MM's permite detectar la auxotrofia de isoleucina y valina generada por la presencia de leucina en cepas himA-.

#### PRUEBA DE MARCADORES DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

A partir de un cultivo ajustado a  $DO_{550nm} = 0.2$ , se hicieron diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  en MD. Se espatularon 100  $\mu$ l en cajas de agar LB y se incubaron a 37°C para obtener colonias aisladas.

Se traspasaron 100 colonias aisladas de cada cepa a una caja de L1, utilizando palillos de madera estériles y se incubaron a 37°C de 14 a 16 hrs.

Se duplicaron los parches por el método de replica de placas (Miller, 1972), en los medios con los antibióticos adecuados para verificar la presencia de los marcadores de resistencia del plásmido y de la cepa correspondiente. Se incubaron las cajas a 37°C de 14 a 16 hrs.

## MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### VISUALIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

Se utilizaron las técnicas de lisados claros y su separación en geles de agarosa por electroforesis, descritas por Maniatis (1982), ó la separación de topoisómeros de acuerdo a las siguientes técnicas:

#### a) Obtención de plásmidos por lisados claros.

Se creció un cultivo de cada cepa en 3 ml de LB hasta una  $DO_{550nm} > 1.0$  (Fase estacionaria con 14 a 18 hrs de cultivo). Los cultivos se centrifugaron en microcentrífuga a 10,000 rpm por 2 min. Las células concentradas en la pastilla se resuspendieron en 100  $\mu$ l de solución I con lisosima y RNasa, se dejaron reposar por 5' a temperatura ambiente, y se lisaron con la enzima lisosima, NaOH y detergente SDS. Se centrifugaron los restos celulares a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se mezcló con fenol-cloroformo (1:1) y se centrifugó 2 min a 10,000 rpm. La fase acuosa superior se mezcló con 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Se incubó a -20°C de 16 a 24 hrs.

Se centrifugó 15 min a 10,000 rpm a 4°C. La pastilla de DNA obtenida se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó y se secó al vacío. Cada muestra se resuspendió en 8 ó 30  $\mu$ l de TE 1x [pH 8.0] y se se añadió 1/6 de volumen de colorante de Ficoll.

#### b) Separación de los plásmidos por electroforesis en geles de agarosa.

Para ello se prepararon geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 0.5x y se montaron en cámaras de electroforesis verticales para corridas de poco tiempo u horizontales en el caso de corridas largas.

Se colocó la muestra de DNA en el gel y se corrió por electroforesis a 80 ó 100 volts, según el caso, siempre con voltaje constante. Al finalizar la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio [0.5  $\mu$ g/ml] por 45' y se fotografiaron las bandas observadas en un transiluminador de luz ultravioleta.

c) Separación de los topoisómeros del plásmido pMS01 por electroforesis en geles de agarosa con cloroquina.

Para ello se utilizó el plásmido pMS01 (Martínez, 1983) con marcador de resistencia  $Ap^r$ . Este plásmido se introdujo en las cepas por transformación. Para extraerlo se utilizó la técnica de lisados claros. El volumen de cultivo total utilizado para cada extracción fué distinto. Esto se debe a que en fases de crecimiento iniciales, la concentración celular es menor y se necesita un mayor volumen de cultivo para obtener el rendimiento de DNA necesario para visualizar los topoisómeros. El volumen utilizado para cada extracción fué el siguiente:

$DO_{550nm} = 0.6$	volumen = 12 ml	
0.8	9 ml	
	1.0	6 ml
	1.3	3 ml
	1.5	3 ml

En todos los casos se centrifugó el volumen total y la pastilla se repartió en dos tubos Eppendorf, en los cuales se hizo la extracción.

El DNA obtenido se resuspendió en 6 a 8  $\mu$ l de TE y se le añadieron 2  $\mu$ l de colorante de Ficoll.

Se hizo un gel de agarosa al 1% en TBE con Fosfato de Cloroquina [25  $\mu$ g/ml]. El tamaño del gel fué de 9 x 14 cm con un espesor de 5 ó 10 mm (40 y 80 ml de agarosa respectivamente). Se dejó dentro de la canastilla y se montó en la cámara horizontal de electroforesis con 750 ó 850 ml de TBE con la misma concentración de fosfato de cloroquina.

Se colocó la muestra de DNA en el pozo del gel, se tapó la cámara y se aplicó corriente a 35 volts (voltaje constante) durante 18 hrs.

Se retiró el gel de la canastilla y se lavó en agua destilada con agitación lenta. Se hicieron dos cambios de agua de un litro (uno cada dos horas). Posteriormente se tiñó en bromuro de etidio [5  $\mu$ g/ml] por 30 min y se lavó 10 min en agua corriente, para quitar el exceso de colorante.

La estrategia empleada para detectar eventos de recombinación entre los plásmidos incFII se describe a continuación:

Se introdujo por conjugación el RTF-2 ( $Km^r$ ,  $Tc^r$ ) en las cepas deseadas, posteriormente, se introdujo de la misma forma el R100t ( $Cm^r$ ,  $Sm-Sp^r$ ). Las bacterias portadoras de ambos plásmidos fueron presionadas con antibióticos, para que los mantuvieran o al menos sus marcadores, por sólo una noche. De estas cajas, se tomaron esadas que fueron resuspendidas en Luria, y se ajustó la  $DO_{550nm}$  a 0.3 para todos los cultivos. Con la dilución a la  $1 \times 10^{-2}$  de estos cultivos, se inocularon 50 ml de LB en matraces nefelométricos de 250ml. Estos matraces se incubaron a  $37^\circ C$  a 200rpm hasta alcanzar una  $DO_{550nm}$  de 0.6, y posteriormente se diluyeron para inocular nuevamente 50ml en las mismas condiciones. El cultivo se mantuvo en fase exponencial hasta por 100 doblajes repitiendo las diluciones. Al finalizar el crecimiento de las cepas, se seleccionaron bacterias capaces de crecer en presencia de los antibióticos para los cuales codifican resistencia ambos plásmidos. Gracias a la  $\Phi$  compatibilidad, al final de este cultivo, la mayoría de las bacterias poseen solo un replicón de los 2 plásmidos incFII. Las bacterias capaces de crecer bajo la selección de los marcadores de ambos plásmidos fueron purificadas, y se les extrajo el material genético extracromosomal y fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa. Aquellas bacterias multiresistentes portadoras de un solo plásmido fueron consideradas como eventos de recombinación.

#### EXPERIMENTO DE DISOCIACION DEL R100t

Para realizar estos experimentos se introdujo por conjugación el plásmido R100t en las cepas deseadas. Los experimentos de disociación se hicieron a partir de precultivos frescos ajustados a una  $DO_{550nm}$  = 0.2 con LB. Los cultivos se hicieron inoculando con 20  $\mu$ l de la dilución a la  $1 \times 10^{-2}$  del precultivo, en 50 ml de LB (dilución 1: 2,500,000). Previamente se calculó que el número de células viables en 50  $\mu$ l a esta DO es de  $1 \times 10^6$ . El cultivo se incubó en matraz nefelométrico de 125 ml, a  $37^\circ C$  con agitación constante a 100 rpm.

A partir del césped bacteriano de una cepa portadora del plásmido pBX404-7, se hizo un cultivo inicial en 5 ml de LB con Tc [ $12.5 \mu g/ml$ ] hasta una  $DO_{550nm}$  = 0.3. En el caso de la cepa HB101, por ser ésta una cepa RecA-, se necesita dejar crecer el cultivo hasta una  $DO_{550nm}$  = 0.5, ya que en esta DO tiene un número de bacterias viables similar al cultivo de las RecA+. Se usó LB con Tc para ejercer presión selectiva y que no se perdiera el plásmido al hacer los cultivos. Cuando cada cultivo llegó a la DO especificada, se colocó a  $4^\circ C$  y con una alcuota del mismo se probó la frecuencia de recombinación del plásmido. A esta frecuencia se le llamó Frecuencia de Recombinación Inicial ( $F_i$ ). El evento que indicó la recombinación en el plásmido, fue la adquisición de la resistencia a km en las bacterias.

A partir de la  $F_i$ , se calculó para cada cepa el número de bacterias/ml de cultivo con plásmido no recombinado. Con el número adecuado de bacterias para cada cepa se comenzó el experimento de recombinación homóloga. Estas bacterias se tomaron de una alcuota del cultivo a  $4^\circ C$ , y con ellas se inocularon cultivos en LB con  $12.5 \mu g$  de Tc/ml. El número de bacterias sembrado se verificó haciendo cuentas viables en placas con Tc [ $12.5 \mu g/ml$ ]. Se incubaron los cultivos hasta alcanzar una densidad celular que permitiera observar el evento de recombinación del plásmido. La frecuencia de recombinación de este plásmido, reportada para bacterias RecA- es de  $6.54 \times 10^{-6}$ , por lo tanto se incubó hasta que las bacterias alcanzan una densidad celular de  $1 \times 10^8$  cél/ml con el fin de poder observar el evento. Al llegar a esta densidad, se calculó la Frecuencia de Recombinación Final de la forma ya mencionada.

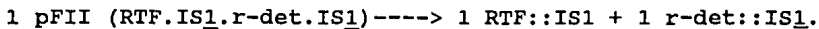
Cada 12 hrs se diluyó una parte del cultivo con medio LB hasta llevarlo a una  $DO_{550nm}$  = 0.2. Con 20  $\mu$ l de la dilución a la -2 de este cultivo se inocularon 50 ml de LB fresco y se incubó nuevamente a  $37^\circ C$  con la misma agitación. La prueba de marcadores de resistencia a antibióticos se practicó al finalizar el experimento de disociación.

## RESULTADOS.

En este trabajo se estudiaron los factores involucrados en la recombinación homóloga de las IS<sub>1</sub> durante la disociación de los plásmidos multirresistentes FII en S.typhimurium y en E.coli.

### MODELO EXPERIMENTAL.-

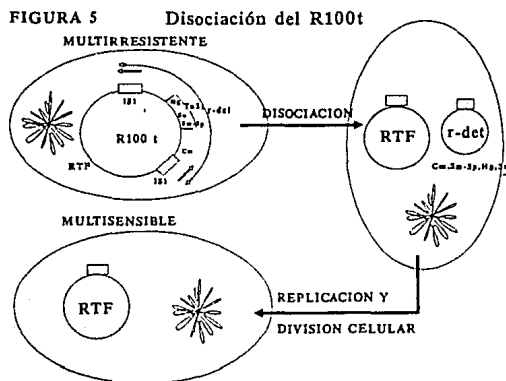
La disociación de los plásmidos FII es un evento dependiente de RecA, en el que la recombinación homóloga de dos IS<sub>1</sub> separa los módulos informacionales de estos plásmidos:



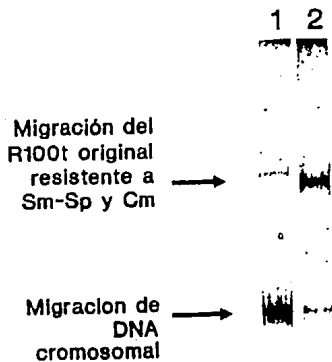
Este evento puede detectarse gracias a que el r-det, el módulo que porta la mayoría de los genes de resistencia a antibióticos, no es capaz de replicarse autónomamente. Esta característica provoca que las cepas bacterianas portadoras de plásmidos FII, pierdan la resistencia a antibioticos cuando ocurren eventos de disociación.

En este estudio, se utilizó como herramienta básica de trabajo, la detección de eventos de disociación del plásmido R100t (incFII), y a menos que se indique de otra forma, los resultados reportados se refieren a experimentos de disociación del R100t. La región r-det del plásmido R100t porta la información para conferir a su hospedero, resistencia a Cloramfenicol, Estreptomicina-Espectinomicina, Sulfas, así como a Mercurio (Cm, Sm-Sp, Su y Hg respectivamente) (Figs. 3 y 5). Los genes de resistencia a Sm-Sp, Su y Hg forman parte del transposon Tn<sub>21</sub>; mientras que la resistencia a Cm, no esta en un transposón. Los eventos de disociación (Fig.5) pueden cuantificarse detectando unicamente la aparición de células Cm<sup>S</sup> y verificando después en

estas, la pérdida de los otros marcadores de resistencia  $Sm^r-Sp^r$  y  $Su^r$ . Finalmente, la presencia de plásmidos tipo RTF en estas células se determina analizándolos por electroforesis en geles de agarosa (Fig. 6).



**FIGURA 6.-ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE PLASMIDOS RESISTENTES (1) Y SENSIBLES (2) A  $Sm-Sp$  Y  $Cm$ , AISLADOS DE LA CEPA HW206 DE *S.typhimurium* AL FINALIZAR UN EXPERIMENTO DE DISOCIACION**



## EFFECTO DE LA INFORMACION GENETICA DEL RTF EN LA DISOCIACION DE LOS PLASMIDOS FII.

Uno de los puntos claves en el evento de disociación, es la identificación de los factores involucrados. Hasta ahora, no se sabe si el RTF de los pFII aporta alguna función estructural o enzimática involucrada con la disociación. Como se mencionó en la introducción, existen reportes que sugieren que el RTF codifica para moléculas que modifican la frecuencia de recombinación de la IS<sub>1</sub> de los pFII (Chandler et.al 1982) y la frecuencia de la recombinación generalizada (Chernin et.al 1980). Sin embargo, no sabemos si estas funciones son esenciales para la disociación, ni si estan involucradas o no con la regulación de la misma.

Para probar la aportación del RTF al patrón de disociación de los pFII, se construyeron plásmidos con replicones que no pertenecen al grupo de incompatibilidad FII, portadores de un módulo similar al r-det (pMG). Como replicón se empleó el plásmido F'lac, y como módulo similar al r-det, se eligió al Tn<sub>9</sub>, que es un transposón con un gene de resistencia a Cm flanqueado por dos IS<sub>1</sub> directas.

Para construir a los pMG, primero se transfirió por conjugación el F'lac a la cepa GM2198 dam::Tn<sub>9</sub>. Posteriormente para seleccionar a los plásmidos F'lac::Tn<sub>9</sub>, esta cepa se conjugó con la C600 (lac-, Cm<sup>S</sup>), y se seleccionaron células Cm<sup>R</sup> (Tn<sub>9</sub>), en el medio selectivo adecuado. Se verificó la presencia del plásmido F'lac en las células Cm<sup>R</sup> con el fago R17 que unicamente infecta a células con pili codificados por estos plásmidos. Se seleccionaron 20 colonias independientes Lac- en medio McConkey, y se

les verifico nuevamente tanto la infección con R17, como la resistencia a Cm. Los pMG (Cm<sup>R</sup> Lac-) permiten la detección de eventos de disociación pues generan un fenotipo Cm<sup>S</sup>, Lac-. Este sistema permite diferenciar el evento de disociación de otros eventos, como la transposición conservativa (Cm<sup>R</sup> Lac+), la transposición replicativa (Cm<sub>R</sub> Lac-) o la escisión precisa (Cm<sub>S</sub>, Lac+). Para estudiar el fenotipo Lac conferido por el plásmido, se utilizaron células con una deleción del operón lac (/ \ lac), lo que evita la restauración del fenotipo Lac+ por recombinación homóloga (plásmido/cromosoma).

Dos de estos plásmidos, pMG1 y pMG2, se transfirieron por conjugación a diferentes cepas de E.coli (wt y recA-) y de S.typhimurium (wt, dor- y recA-) para poder comparar sus patrones de disociación con los reportados para pFII.

En la Figura 7, se presenta un esquema del modelo experimental F'lac:Tn<sub>9</sub>, la construcción de dicho modelo, y los resultados de los experimentos de disociación. En algunas de las bacterias finalistas se probó la presencia del pF'lac infectando con el fago R17.

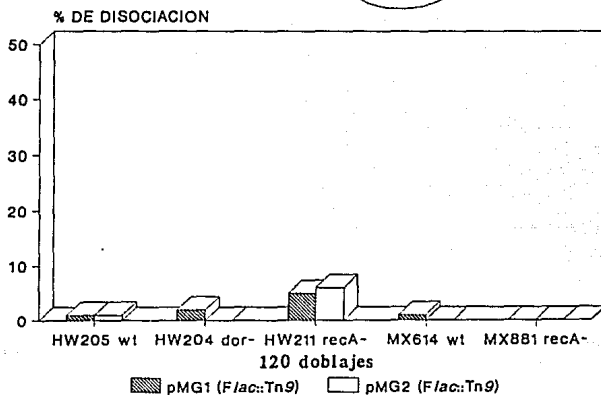
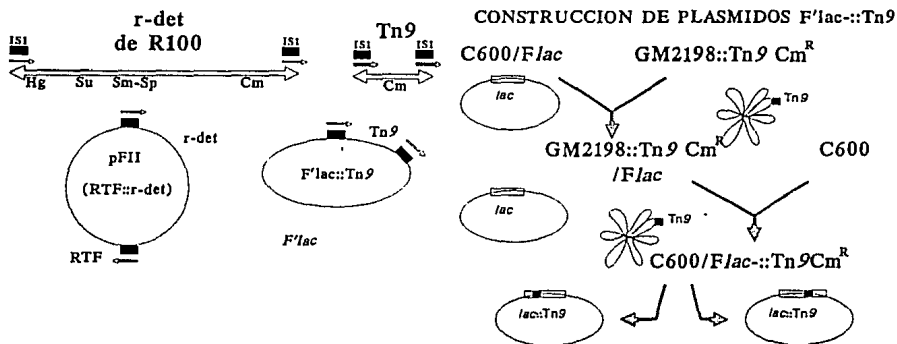
Los pMG1 y pMG2 se disociaron a baja frecuencia en la cepa silvestre de E.coli y en las cepas silvestre, dor-, y recA- de S.typhimurium. Este resultado es claramente diferente al reportado para la disociación de los pFII (tabla 5 y Fig 8):  
1o.- Los valores de disociación para S.typhimurium y para E.coli resultaron similares.  
2o.- Las cepas recA- y dor- de S.typhimurium no presentaron la reducción de dos ordenes de magnitud respecto a la cepa silvestre e inclusive la cepa recA- mostró valores



superiores a los de la silvestre.

# FIGURA 7.-MODELO, CONSTRUCCION Y DISOCIACION DE LOS pMG EN *S.typhimurium* Y *E.coli*

El Tn9 como modelo de r-det



**DISOCIACION DEL R100t EN CEPAS DE E.coli Y S.typhimurium CON UN NUMERO DIFERENTE DE COPIAS DE IS1.**

La similitud entre la disociación de los plásmidos FII y la resolución de un cointegrado de transposición replicativa de la IS1 permite suponer que ambos eventos comparten cuando menos algunas funciones. En este sentido, resulta importante determinar si la presencia o ausencia de la IS1 modifica los patrones de disociación, y poder determinar si esta, aporta factores que actuen en trans involucrados en la disociación (FTD).

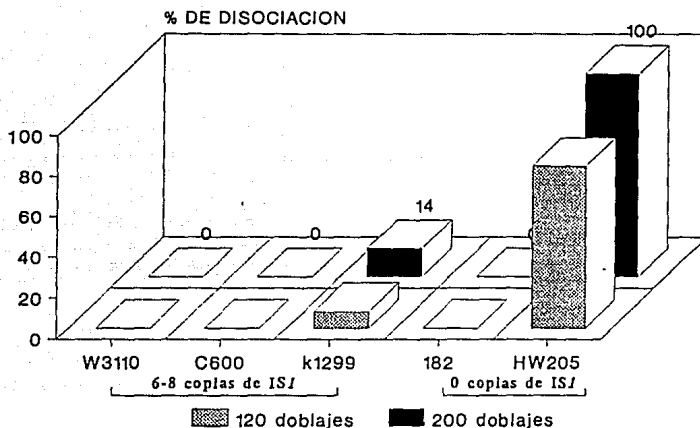
La presencia de IS1 cromosomales en E.coli y su ausencia en S.typhimurium resalta al analizar las diferencias entre estas bacterias, respecto a los patrones de disociación de los pFII. Una posible explicación de este comportamiento diferencial, es que la IS1 codifique o titule algún factor, involucrado con la disociación de los pFII, de tal forma que la presencia de múltiples copias de la IS1 repriman la disociación.

Para detectar la existencia de la actividad reguladora o inhibidora de algún FTD codificado por IS1, que bloquee la disociación de plásmidos FII en E.coli, se utilizaron cepas con y sin IS1 cromosomales, portadoras del plásmido R100t. Las cepas empleadas fueron la 182 (J.Ramírez, carente de IS1), la C600 (8 copias), la K1299 (8 copias) y una cepa de S.typhimurium HW205 (carente de IS1). La cepa K1299 (himA-) se empleo por ser una E.coli con una disociación detectable (aunque baja respecto a S.typhimurium A.Garibay 1990).

En la Figura 8, se muestra un resultado representativo de los experimentos de disociación realizados con estas cepas. La cepa 182/R100t, a pesar de que no posee copias cromosomales de

IS1, no es capaz de disociar el R100t.

FIGURA 8.-DISOCIACION EN AUSENCIA DE IS1 CROMOSOMAL



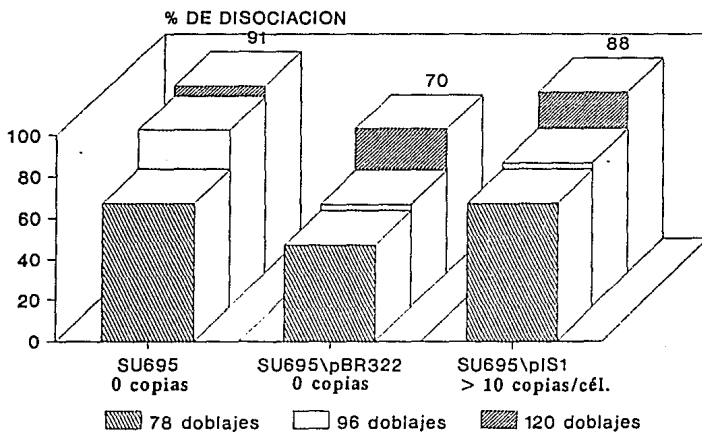
El resultado anterior sugiere la ausencia de FTD negativos. Sin embargo, es posible que en E.coli esté reprimida la disociación independientemente de las copias de IS1 cromosomales, por lo que se investigó el efecto de múltiples copias de IS1 en la disociación en S.typhimurium.

Para modificar el número de copias de IS1 en S.typhimurium, se empleó un derivado del plásmido multicopia pBR322 con una IS1 activa (pIS1). La cepa Su695 se transformó con el pIS1 y

con el pBR322, y posteriormente por conjugación se les transfirió el plásmido R100t.

En la Figura 9 se presentan resultados representativos de los experimentos de disociación con la cepa Su695 con y sin copias de IS<sub>1</sub>. Como puede apreciarse, no hay un cambio significativo al modificar el número de copias de IS<sub>1</sub>. Lo anterior, sugiere la ausencia de FTD reguladores o represores codificados por la IS<sub>1</sub>.

FIGURA 9.- DISOCIACION EN PRESENCIA DE MULTIPLES COPIAS DE IS<sub>1</sub> EN *S.typhimurium*

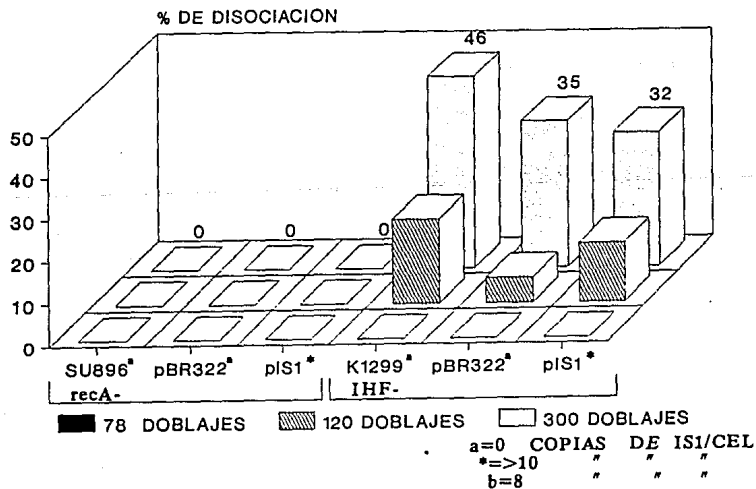


En este trabajo, se intentó detectar la acción de una resolvasa (Págs 9 y 12) codificada por la IS<sub>1</sub> capaz de disociar los pFII, que tienen la estructura esperada de un intermediario de la transposición replicativa de la IS<sub>1</sub>. Para detectar la resolvasa, o algún FTD que la incrementase, se utilizaron dos cepas, SU695 rec A- (*S.typhimurium*) y K1299 him A- (*E.coli*). La cepa Su695 rec A- representó un modelo ideal para la detección

de estos FTD positivos, ya que es una cepa en la que los eventos de disociación (que normalmente ocurren a alta frecuencia) han sido disminuidos por una mutación involucrada con los sistemas de recombinación homóloga general. La cepa K1299 fue seleccionada por ser una E.coli en la que ya hay un poco de disociación, pensando que tal vez los FTD positivos incrementen su frecuencia. A ambas cepas se les modificó el número de copias de IS1 activas transformándolas con el pIS1, y posteriormente se les transfirió por conjugación el R100t.

Los resultados obtenidos en los experimentos de disociación (Fig.10) muestran claramente que el incremento en el número de copias de IS1, no tiene ningún efecto sobre la disociación. Estos resultados junto con los anteriores sugieren la inexistencia de FTD positivos o negativos codificados por IS1 involucrados en la disociación de plásmidos FII.

FIGURA 10.- DISOCIACION EN K1299 y SU896 EN PRESENCIA DE MULTIPLES COPIAS DE IS1



EFEECTO DE LOS GENES dor y himA SOBRE LA DISOCIACION  
DE LOS PLASMIDOS FII EN E.coli.

Respecto a las diferencias entre E.coli y S.typhimurium que pudieran explicar los patrones de disociación en ambas bacterias, es posible que cierta información, no sea idéntica, o no se encuentre en alguna de las bacterias: A) Es probable que el gen dor identificado en S.typhimurium no sea funcional o no se encuentre en E.coli y/o B) la proteína IHF que se une a las IR's de la IS1 bloquee la disociación en E.coli y tal vez la IHF de S.typhimurium (Him A 3 Aa. diferente a la de E.coli) no lo haga. A.Garibay (1990) estudió la disociación de pFII en mutantes IHF- en E.coli y postuló que la IHF inhibe la disociación en E.coli. El carácter pleiotrópico de la IHF dificulta el entendimiento de su participación en la disociación.

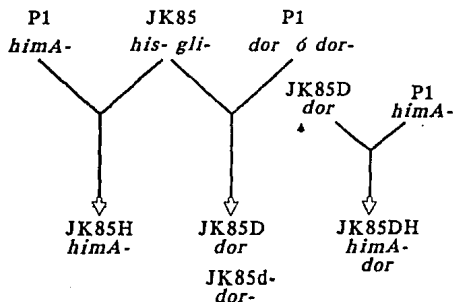
Para estudiar el efecto de ambos genes, se construyó una batería de cepas de E.coli en las cuales se introdujeron por transducción con P1 los genes dor+ y dor- de S.typhimurium, y el gene himA-(IHF-) de E.coli. Esta batería de cepas se derivó de la cepa JK85 (hisS- y gliA-). Los genes hisS, y gliA flanquean el gene dor en el mapa de S.typhimurium (Figura 11). Las cepas Su695 dor+, HW205 (dor+) y HW204 (dor-) de S.typhimurium se lisogenizaron con el fago P1 tS Cm<sub>r</sub>. También se lisogenizó la cepa K1299 (himA-) de E.coli, la cual porta una resistencia a Tetraciclina en una región muy próxima a la delección de himA, lo que permite seguir fácilmente su transferencia. Los Fagos obtenidos al inducir por temperatura (42.C) el ciclo lítico en estas cepas fueron empleados para transducir la cepa JK85 (Figura 11). La batería de cepas así construida nos ofrece los siguientes genotipos: JK85

wt, JK85D dor+, JK85d- dor-, JK85h- himA, JK85Dh- dor+,himA-.  
 La detección del gene dor es indirecta, a travez de la obtención de transductantes His+ y Gli+, ya que estos marcadores flanquean a dor en S.typhimurium.

FIGURA 11.-TRANSDUCCION DE dor Y himA A E.coli

LOCUS DEL GENE <i>dor</i> EN EL CROMOSOMA DE <i>S.typhimurium</i>	<i>E.coli</i> posicion gene (min)	<i>S.typhimurium</i> posicion gene (min)
	54	52
	<i>gua A,B</i>	<i>gua A,B</i>
	<i>his S</i>	<i>his S</i>
		<i>dor</i>
	55	54
	<i>gli A</i>	<i>gli A</i>
	<i>pur I(G)</i>	<i>pur G(I)</i>

CONSTRUCCION DE LAS CEPAS DE *E.coli*  
*himA-*, *dor*, *dor-*, y *dor himA-*

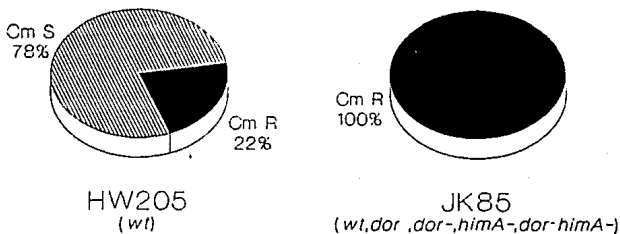


Los P1 empleados para transducir a la cepa JK85(*hisS*-,*gliA*-  
 Tet<sup>r</sup>) se obtuvieron de las siguientes cepas: K1299 (*himA*-,Tet<sup>R</sup>),  
 HW205 y HW204 (*hisS*+,*gliA*+,y *dor* y *dor-* respectivamente).

	LAMBDA		TC	<i>himA</i>
	Cin	Cin CII		
JK85	lisis	lisis	S	+
JK85H	lisis	no	R	-
JK85DH	lisis	no	R	-

Posteriormente se les transfirió por conjugación el plásmido R100t, y se llevaron a cabo experimentos de disociación. Los resultados que se muestran en la Figura 14 indican que en todas las cepas de esta batería, la frecuencia de disociación es menor que la obtenida en S.typhimurium.

FIGURA 12.-DISOCIACION EN *S.typhimurium*  
Y *E.coli dor, dor-, himA- Y dor himA-*



78 doblajes.

A.Garibay (1990) reportó que al añadir 80µg de Novobiocina (Nov), un inhibidor de la subunidad B de la girasa, se incrementaba la disociación del R1-19 en aproximadamente un 20% en 120 doblajes celulares. A partir de este dato, se pensó en utilizar Nov o Coumermicina ((Cou) otro inhibidor de la girasa) en experimentos de disociación en la batería de cepas JK85.



Se hicieron experimentos de disociación con las cepas JK85 y JK85D utilizando diferentes concentraciones de Nov y de Cou, para rastrear el punto de efecto máximo (estos experimentos de disociación tuvieron una duración de  $\approx 38$  doblajes por cepa). En la cepa JK85D, pero no en la JK85 se observaron eventos de disociación. También se rastreó el efecto de la Nov en la cepa HW205/R100t y el efecto observado corresponde al mismo de la cepa JK85D. Las concentraciones de mayor efecto, fueron 40 y 60  $\mu\text{g}$  de Nov/ml, pero con 60 se afectó mas la curva de crecimiento que con 40, por lo que se escogio esta última concentración para efectuar los experimentos posteriores en toda la bateria de cepas. La Cou se probó exclusivamente en la cepa JK85 y en dos concentraciones (2.5 y 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los resultados correspondientes a los experimentos de disociación, con la cepa HW205/R100t, con Nov, se presentan en la Figura 13.

Los resultados que se obtuvieron con la cepa JK85/R100t y sus derivadas en experimentos de disociación con y sin Nov, se muestran en la Figura 14.

La cepa JK85 no modificó su patrón de disociación en ninguna de estas circunstancias. Los valores de disociación en la cepa JK85D dor+ al tratarla con Nov, son similares a los obtenidos en S.typhimurium. El efecto del gene dor se hace evidente al comparar estos valores con los obtenidos en la cepa JK85d-, en donde no se presentó la disociación en las condiciones experimentales utilizadas. La cepa JK85H himA- no mostro disociación, pero el resultado respecto a la participación de IHF en la disociación se ve claramente con la cepa JK85DH, donde no sólo no incrementa la disociación, sino que disminuye, respecto a la cepa JK85D; la

disociación disminuye en ausencia de la proteína IHF.

FIGURA 13.- EFECTO DE LA NOVOBIOCINA EN LA DISOCIACION EN S.typhimurium (HW205)

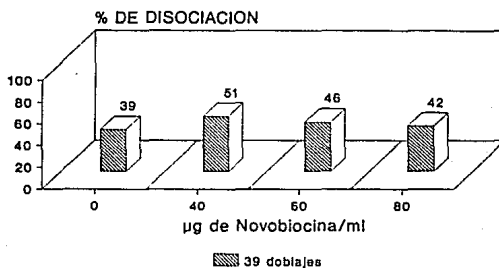
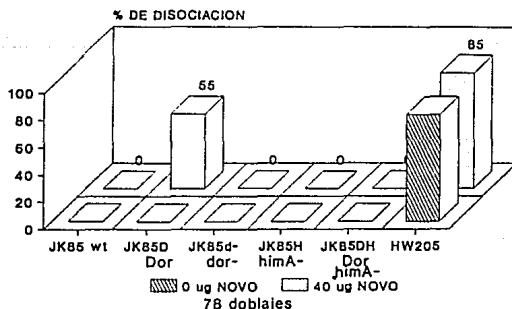


FIGURA 14.- EFECTO DE LA NOVOBIOCINA EN LA DISOCIACION EN *E.coli* wt, *dor* *dor-*, *himA-* y *dor himA-*.

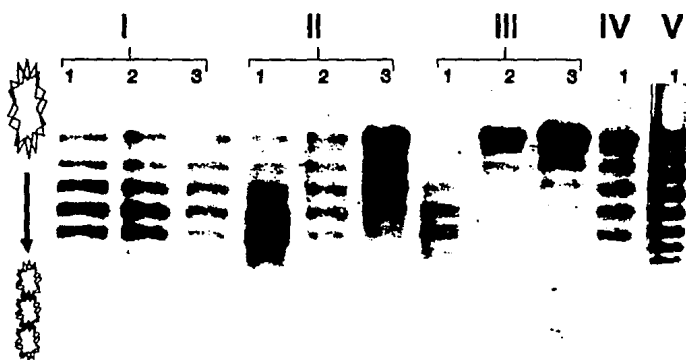


La Cou produjo un efecto similar aunque no tan marcado como el obtenido con Nov en las cepas JK85 y JK85D. Los resultados anteriores indican que la Nov activa o induce la disociación de los plásmidos FII en cepas de E.coli portadoras de un genedor.

Para estudiar el efecto de Nov sobre el superenrollamiento e identificar el patrón topológico del DNA adecuado para la recombinación de las secuencias IS1 durante la disociación de los plásmidos FII, se decidió analizar los topoisómeros de las cepas claves con y sin inhibidores. Con la colaboración de A.Garibay y de J.Membrillo, se transformaron las cepas HW205, JK85, JK85D, JK85d-, JK85h-, y JK85Dh- con el plásmido multicopia pMS01, y se obtuvieron lisados claros en las mismas condiciones de los experimentos de disociación. Los topoisómeros del plásmido se separaron por electroforesis en un gel de agarosa con cloroquina y el negativo de la fotografía del gel se sometió a barrido densitométrico a 620nm en un espectrofotómetro DU-8B de Beckman, las coordenadas obtenidas para cada curva se regraficaron usando el programa Harvard Graphics (Fig.15). En la fotografía que se muestra es evidente la diferencia entre el patrón de topoisómeros de las cepas silvestres de E.coli (JK85 fig 15-II) y S.typhimurium (Su695 fig 15-I). El patrón de S.typhimurium está relajado respecto al patrón de E.coli. La cepa JK85D (dor fig15-III-1), no presenta ninguna modificación respecto a la JK85 (fig 15-II-1), mientras que las cepas JK85H y JK85DH (himA-, y dor,himA- fig 15-IV y V respectivamente) tiene un patrón casi tan relajado como el de S.typhimurium. Al añadir Nov, todos los patrones se relajan, pero en las cepas JK85 y JK85D el efecto es mucho mayor que

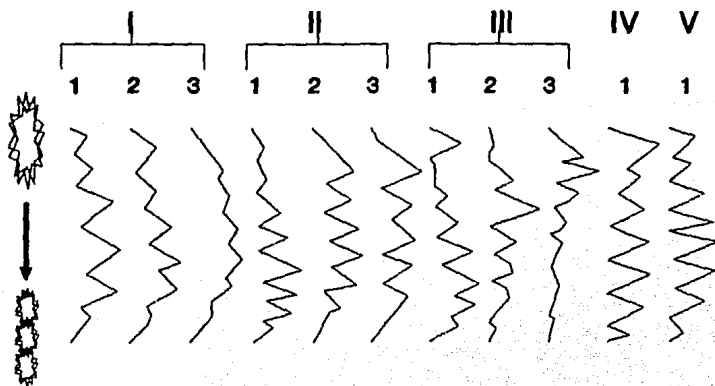
**FIGURA 15.- Efecto de la novobiocina en el patrón de superenrollamiento del pMS01 en *E.coli* y *S.typhimurium*.**

A).-Fotografía de la electroforesis del pMS01 aislado de las cepas:(I) SU695, (II) JK85, (III) JK85D, (IV) JK85H y (V) JK85DH



[Nov]/m: 0 (1), 40 (2) y 60 (3).

B).-Gráficas elaboradas con el programa Harvard Graphics, del barrido densitométrico (DO<sub>620nm</sub>) del negativo de la fotografía superior



en la cepa Su695. Esto sugiere que los inhibidores de la subunidad B de la girasa generan un patron TOPOLOGICO adecuado para que la disociación de los plásmidos FII se lleve a cabo en E.coli dor+.

Es evidente que el gene dor es indispensable en la disociación de los pFII, pero no sabemos si su efecto resulta de un incremento en la recombinación homóloga de plásmidos, o de un efecto directo sobre la disociación. La siguiente sección describe los trabajos realizados para determinar el efecto del gene dor en la recombinación homóloga de plásmidos grandes (FII) y pequeños (pBX404-7).

## EFFECTO DEL GENE dor EN LA RECOMBINACION HOMOLOGA DE PLASMIDOS

Watanabe et.al. (1980 y 1982) al descubrir el gene dor y su efecto en la disociación, estudiaron su papel en la recombinación homóloga postconjugacional y de transferencia, y concluyeron que dor no las afecta. Como diferentes enzimas de recombinación operan sobre diferentes sustratos, se decidió analizar el papel del gene dor en la recombinación homóloga de dos sistemas plasmídicos (en plásmidos FII, y en plásmidos pequeños multicopia).

La recombinación homóloga entre plásmidos FII se estudió en los plásmidos R100t y RTF-2, detectando moléculas recombinantes con los marcadores de resistencia a antibioticos de ambos plásmidos.

El estudio de la recombinación homóloga entre plásmidos pequeños multicopia se realizó con el plásmido pBX404-7 (pBX). El pBX fue diseñado para cuantificar eventos de recombinación, simplemente por la aparición del marcador de resistencia a kanamicina. La resistencia a kanamicina, se regenera cuando dos secuencia repetidas del interior de este gene recombinan (Xu et.al. 1988).

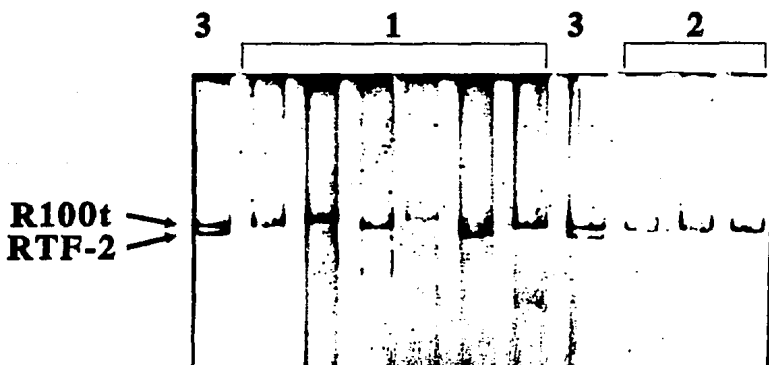
En las cepas de S.typhimurium HW205, HW204 y HW211 (wt, dor- y recA- respectivamente) se estudió el efecto del gene dor en la recombinación homóloga de plásmidos empleando ambos sistemas. Los resultados obtenidos siempre mostraron la misma tendencia. En la Figura 16 se presenta el promedio de varios experimentos, y en la parte inferior se muestran algunos plásmidos recombinantes obtenidos de las cepas HW205 y HW204.

**FIGURA 16.- EFECTO DEL GENE *dor* EN LA RECOMBINACION HOMOLOGA DE PLASMIDOS EN *S.typhimurium***

CEPA	PLASMIDOS FII	pBX404-7
HW205 wt	1	1
HW204 <i>dor</i> -	1	0.2-0.5
HW211 <i>recA</i> -	<0.01	0.01

Frecuencia relativa de recombinación de dos sistemas: pFII) grandes plásmidos unicopia (R100t y RTF-2). pBX404-7) pequeño plásmido multicopia. los resultados de cada sistema son independientes.

Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos recombinantes obtenidos de las cepas HW205 (1) y HW204 (2) de *S.typhimurium*, aisladas al concluir un experimento de recombinación con los plásmidos R100t y RTF-2 (3).



En las cepas de E.coli JK85, JK85D y JK85DH (wt, dor y dor himA-) se estudio el papel del gene dor y el efecto de la Novobiocina en la recombinación homóloga de plásmidos pequeños. Como en el caso anterior, los resultados siempre mostraron la misma tendencia, y en la Figura 17 se presenta el promedio obtenido.

**FIGURA 17.-EFECTO DEL GENE dor Y LA NOVOBIOCINA EN LA RECOMBINACION HOMOLOGA DEL pBX404-7 EN *E.coli***

CEPA	Novobiocina	
	0µg	40µg
JK85 <i>wt</i>	1	1
JK85D <i>dor</i>	0.64	0.46
JK85DH <i>dor himA-</i>	0.14	0.19

Frecuencia relativa de recombinación homóloga del pBX404-7 con y sin Novobiocina en *E.coli wt*, *dor*, y *dor himA-*

En esta serie de experimentos se puede observar que el efecto del gene dor no es significativo sobre la recombinación homóloga de plásmidos FII, ya que en la cepa Hw204, se obtuvo la



misma frecuencia de recombinación que en la cepa silvestre. En la cepa Hw211 (recA-) en cambio, no se detectaron eventos de recombinación. Respecto a la recombinación homóloga de plásmidos pequeños, en la cepa Hw204 se aprecia una leve disminución respecto a la cepa silvestre. En este caso la mutante recA- está ostensiblemente disminuida en su capacidad de recombinación.

Respecto al efecto del gene dor en la cepa JK85D, este no incrementó los niveles de recombinación del pBX404-7, sino que inclusive, los disminuyó un poco. Este resultado contrasta con la disminución en recombinación del mismo pBX en la cepa dor- en S.typhimurium. En la cepa JK85DH, en la que además del gene dor+, se introdujo también el gene himA-, puede observarse un decremento de un orden de magnitud (en ocasiones llegó a ser de dos ordenes de magnitud) en la recombinación homóloga de plásmidos pequeños. Los experimentos con novobiocina, no alteraron sensiblemente a ninguna de las cepas empleadas.

Estos resultados indican que el gene dor no afecta la recombinación homóloga de plasmidos FII.

## DISCUSION

En el presente trabajo se estudio la participación de diferentes factores en la disociación de los pFII, con la finalidad de comprender mejor el fenómeno y entender el comportamiento diferencial de estos plásmidos en E.coli y S.typhimurium.

### EFEECTO DEL REPLICON EN EL QUE SE LLEVA A CABO LA DISOCIACION

Cuando nos referimos al efecto del replicón en el que se lleva a cabo la disociación, nuestro interés principal es determinar si el RTF de los pFII está involucrado activamente en la disociación, o si simplemente ésta se lleva a cabo de igual forma en cualquier otro replicón. En el caso de los plásmidos F y FII, existen reportes que involucran secuencias y funciones de estos con eventos de recombinación específicos para cada uno (Hopkins et.al. 1980, Chandler et.al. 1982); sin embargo, no se sabe si dichas funciones estan involucrada de alguna forma con la disociación. Considerando esta posibilidad, se decidió probar la disociación de un plásmido estructuralmente similar a los pFII, pero con un replicón diferente.

Para construir dicho plásmido se eligieron el F'lac, y el Tn<sub>9</sub>. La estructura del Tn<sub>9</sub> es similar a la del r-det cuando se encuentra unido al RTF, con las IS1 repetidas directas flanqueando la resistencia a Cm para la que codifica. Los plásmidos PMG (F'lac::Tn<sub>9</sub> con el Tn<sub>9</sub> insertado en lac, Cm<sup>R</sup> Lac-) nos permitieron identificar eventos de disociación (Cm<sup>S</sup> Lac-) sin confundirlos con eventos de transposición conservativa o replicativa (Cm<sup>R</sup> lac+ y lac- respectivamente) ni de escisión (Cm<sup>S</sup> lac+).

Los pMG1 y 2 se emplearon en experimentos de disociación en las mismas condiciones en las que se realizan para los pFII, para determinar el efecto del F'lac sobre este evento.

Los resultados (Fig 7) son claramente diferentes a los reportados para los pFII (Tabla V). La disociación del F'lac::Tn9 no responde a las condiciones de disociación de los pFII. Los valores de disociación resultaron similares para las cepas silvestres de E.coli y S.typhimurium; dichos valores son en el caso de la primera muy altos y en la segunda muy bajos respecto a los reportados para pFII. En el caso de las mutantes de S.typhimurium, es claro que estas no resultaron esenciales para la disociación de los pMG, e inclusive muestran un ligero incremento respecto a la cepa silvestre. Estos resultados indican la participación de factores aportados por el replicón en la disociación, sin embargo, no podemos diferenciar entre las dos siguientes posibilidades:

a) el F'lac aporta funciones que alteran la regulación de la disociación (Hopkins et.al. 1980)

b) el F'lac no posee las funciones que responden a factores involucrados con la regulación de la disociación.

Estas alternativas si bien son diferentes, ambas nos permiten suponer la participación del replicón en la disociación al aportar o no funciones esenciales en la regulación de esta recombinación, y por lo tanto permiten suponer que el RTF si juega un papel importante en la regulación de la disociación de los pFII.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Una consideración debe hacerse en torno a estos experimentos: la estructura del r-det y del Tn<sub>9</sub>. Como se indica en la Figura 7, la única diferencia importante es el tamaño (respecto al conocimiento actual sobre disociación), y su importancia radica en la flexibilidad de ambas moléculas para poner en contacto a las IS<sub>1</sub>. En diversos eventos de recombinación intramolecular se reconoce que existen distancias óptimas para poner en contacto a las secuencias homólogas involucradas. En este sentido, tal vez los eventos detectados en el F'lac::Tn<sub>9</sub> hayan sido afectados por este factor.

Finalmente, es recomendable que se hagan nuevos experimentos en los que se elimine el número de variables desconocidas que participaron en este experimento. Nos referimos a la utilización de los plásmidos pMG, pues no fue posible obtener el plásmido F'lac::r-det, ni el RTF::TN<sub>9</sub>, ambos necesarios, pues se desconoce el comportamiento tanto del F'lac como del TN<sub>9</sub> en cuanto a disociación.

#### **EFFECTO DEL NUMERO DE COPIAS DE IS<sub>1</sub> EN LA DISOCIACION**

Los pFII se disocian con mucho mayor frecuencia en S.typhimurium que en E.coli, curiosamente, la primera carece de copias cromosomales de IS<sub>1</sub>, mientras que en la segunda hay en promedio 8 copias. En P.myriabilis que tampoco posee copias de IS<sub>1</sub> cromosomales, esta secuencia también recombina a alta frecuencia, pero a diferencia de S.typhimurium en lugar de disociar los pFII, se amplifica el r-det. Esta observación nos lleva a suponer que la secuencia IS<sub>1</sub> porta información que actúa en

trans, la cual inhibe la disociación. Además de este argumento, la similitud estructural entre los pFII y los cointegrados intermediarios de transposición replicativa, también permiten suponer una actividad de la IS<sub>1</sub> en la disociación, sólo que en este sentido, sería una actividad de resolvasa o algo similar, que ayudara en la disociación, y un represor de la misma.

Ante cualquiera de las alternativas anteriores, resulta de gran interés determinar la existencia de actividades que funcionen en trans, codificadas por la IS<sub>1</sub>, que modifiquen la disociación. En los trabajos realizados por diversos investigadores con propósitos similares al nuestro, se ha intentado determinar la existencia de factores que actúen en trans codificados por IS<sub>1</sub>; solamente los trabajos de Braedt han podido identificar alguna actividad, pero su estrategia experimental como se menciona previamente, se basa en la detección de eventos generados y aislados rápidamente tras la transformación. En términos generales, se ha tratado de buscar la actividad de factores codificados por IS<sub>1</sub> en sistemas que no son activos para la recombinación de IS<sub>1</sub> (E.coli). En este trabajo se estudiaron los efectos de múltiples copias de IS<sub>1</sub> en la disociación de pFII en el sistema tradicional, y en un sistema activo para la disociación, S.typhimurium.

En 1989 J.Bustos reportó la disociación de pFII en una cepa clínica de S.typhimurium con copias cromosomales de IS<sub>1</sub>. Sin embargo, se debe considerar la verificación de la actividad de las copias de IS<sub>1</sub> involucradas, y no solo probar su presencia. Umeda y Ohtsubo (1991) reportaron la existencia de 4 tipos de IS<sub>1</sub> con diferencias en la secuencia nucleotídica en E.coli K12, lo

que nos permite suponer que el numero de copias de IS1 no indica el numero de copias **activas** de IS1. Es por esto que en nuestro trabajo incluimos como portador de copias de IS1 al plásmido multicopia pBR322::IS1, que porta una secuencia IS1 activa (Bustos y Gomez 1987).

Para identificar actividades en trans codificadas por la IS1 involucradas en la disociación, se emplearon cepas de E.coli y S.typhimurium con diferente numero de copias de IS1, partiendo de las siguientes estrategias:

-se trato de identificar un papel inhibitorio de la IS1, determinando la disociación de pFII en una cepa de E.coli sin copias de IS1 (182) y en una cepa de S.typhimurium con multiples copias de IS1 (Su695/pIS1).

-se trato de identificar un papel positivo de la IS1, determinando la disociación de pFII en la cepa K1299 de E.coli que por la delección que porta en himA disocia pFII (aunque a baja frecuencia) y en una cepa de S.typhimurium recA- que por esta mutación no disocia pFII; introduciendoles multiples copias de IS1 (K1299/pIS1 y Su695 recA-/pIS1 respectivamente).

La construcción de estas cepas nos permitio el análisis directo del efecto del numero de copias de IS1 en sistemas que normalmente estan activos o inactivos en disociación. Como puede apreciarse en las Figuras 8, 9 y 10, el número de copias de IS1 no modifica (ni positiva ni negativamente) el patrón de disociación de las cepas empleadas. Este resultado nos hace suponer que la IS1 no aporta FAT's positivos ni negativos involucrados en la disociación. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el efecto de

estos no sea detectable con el sistema empleado, ya sea por que tienen una actividad muy baja, o por que factores ajenos a la IS1 involucrados en la regulación de la disociación restringen su actividad. De cualquier forma, la regulación gruesa de la disociación no se ve afectada por el numero de copias de IS1 en E.coli ni en S.typhimurium.

Partiendo de esta conclusión, resulta intrigante el numero de copias de IS1 en E.coli y en S.typhimurium. Tal vez, la alta actividad de disociación de S.typhimurium inestabiliza la permanencia de copias de IS1 en su genoma. Seria interesante determinar si el numero de copias activas de IS1 en una bacteria es inversamente proporcional a la capacidad para recombinar a la IS1 de cada bacteria.

#### **EFECTO DE LOS GENES dor Y hima EN LA DISOCIACION**

La mutación del gene dor descrito por Watanabe et.al. (1980) reduce dos ordenes de magnitud la disociación en S.typhimurium. Este efecto, no ha sido caracterizado a fondo, apenas se sabe que no involucra recombinación homóloga cromosomal, y se sugiere que dor solamente participa en eventos de recombinación sitio especifica, de secuencias particulares como la IS1. A diez años de su descripción, aun se ignora si dor es parte de un sistema de recombinación o si es una recombinasa que opera junto con RecA, tampoco se sabe si participa en eventos de recombinación plásmidicos, o si en efecto, su acción es secuencia especifica. También se ignora si E.coli tiene un gene equivalente.

Por lo antes expuesto, se decidió introducir una región del genoma de S.typhimurium que contiene el gene dor en E.coli, y probar sus efectos en ambas bacterias, determinando patrones de disociación, y recombinación de plásmidos grandes de bajo numero de copias y pequeños multicopia.

La proteína IHF participa en diversos eventos de recombinación específica, aportando aparentemente una topología específica en el DNA sobre el que tiene afinidad. En los extremos de la IS1 se identificaron sitios de unión para la IHF, que se sobrelapan con los sitios de unión para las proteínas InxA y la transposonasa (que codifica IS1). Estos sitios participan en la regulación de la expresión genética y en el reconocimiento de la transposonasa de la IS1. Nuestro grupo ha estudiado la disociación de pFII en cepas de E.coli sin IHF (delección de himA) y los resultados sugieren que la presencia de esta proteína bloquea la disociación. Sin embargo, no se sabe si el incremento en la disociación de las cepas IHF- se debe a un efecto directo sobre los sitios de reconocimiento de la IHF o al relajamiento general en el DNA que su ausencia provoca. Esta ambigüedad, requiere que se pruebe el efecto de IHF en una cepa en la que la disociación sea frecuente.

Para estudiar el efecto de ambos genes en la disociación, se construyó una batería de cepas derivadas de la JK85 (Figura 11), JK85D dor, JK85d dor-, JK85H himA- y la JK85HD dor himA- y la isogénica silvestre JK85 wt. Para nuestra desilusión, en ninguna de estas cepas se detectaron eventos de disociación (Fig. 12).



Al considerar que el patron de superenrollamiento del DNA de S.typhimurium es mas relajado que el de E.coli, y que Nov (que relaja el patron de superenrollamiento) incrementa cuando menos en un 10% la disociación en S.typhimurium (A.Garibay 1990), decidimos modificar las condiciones de superenrollamiento en la batería de cepas JK85. Se identificó la concentración adecuada de Nov por sus efectos en la curva de crecimiento y en la disociación en S.typhimurium (Fig. 13), se procedio a probar su efecto en las cepas JK85.

Los resultados (Fig.14) indican claramente que se requiere el gene dor y Nov para obtener niveles de disociación proximos a los obtenidos en S.typhimurium, y que la ausencia de IHF disminuye los niveles de disociación.

El efecto en la disociación en las cepas JK85 se asocio con la presencia de dor y con una modificación en el superenrollamiento que genera la novobiocina.

Como se aprecia en la Figura 15, los patrones de superenrollamiento de la cepa de S.typhimurium (Su695) sin Nov es mas relajado que el de las cepas JK85 himA+ sin Nov, mientras que las cepas himA- presentan un patron similar al de S.typhimurium. Al añadir Nov, los patrones de las cepas JK85 himA+ se hacen mas parecidos a los de S.typhimurium. Debe aclararse que el patron de topoisómeros en S.typhimurium tambien se releja en presencia de Nov, y que como ya dijimos esta incrementa los niveles de disociación; sin embargo, el efecto en el patrón de topoisómeros es más dramático en E.coli. Queda claro que todas las cepas JK85 fueron probadas en condiciones de superenrollamiento similares a

las de S.typhimurium, y que sólo en las cepas dor se observó disociación. Es decir que se requiere de un ambiente topológicamente adecuado, además de un gene dor activo, para poder disociar con alta frecuencia.

Estos resultados sugieren que E.coli carece del gene dor. Para probar lo anterior sugerimos que se pase por transducción con P1 la región hisS-gliA de E.coli a una doble mutante de S.typhimurium, la cual perdera la actividad de dor si esta hipótesis es correcta.

Para descartar un efecto del gene dor en la recombinación homóloga plasmídica, se diseñaron varios experimentos tanto con pFII como con el pBX404-7 en cepas dor+ y dor- de S.typhimurium. También se realizaron experimentos de recombinación con el pBX404-7 con y sin Nov en la bacteria de cepas JK85. Los resultados obtenidos (Figs 16 y 17) no muestran un efecto claro de dor o de Nov sobre la recombinación plasmídica, por lo que suponemos que el efecto del gene dor si es sobre secuencias específicas.

## CONCLUSIONES

La disociación de plásmidos F'lac::Tn9 de estructura similar a los pFII no responde a los mismos requerimientos que los pFII, por lo que concluimos que el replicón RTF de los pFII afecta la regulación de los patrones de disociación por cualquiera de los dos siguientes mecanismos:

-El RTF provee funciones enzimáticas específicas involucradas con la disociación.

-El RTF porta sitios reconocidos por enzimas involucradas con la disociación.

La presencia o ausencia de secuencias IS1 no es un factor determinante para activar o reprimir la disociación de los pFII en E.coli o S.typhimurium. Y es claro, que esta secuencia no aporta FAT's lo suficientemente fuertes para modificar los patrones de disociación de los pFII en ninguna de las dos bacterias.

La ~~transducción~~ transducción del gene dor a E.coli junto con una adecuada topología del DNA, son suficientes para la activación o liberación de la disociación de los pFII.

La ausencia de la proteína IHF puede generar un patrón topológico adecuado para la disociación, sin embargo esta ocurre en frecuencias mucho menores a las reportadas para S.typhimurium. En presencia de un gene dor y con una topología adecuada, la ausencia de IHF reduce la disociación, es decir, apesar de su efecto en la topología del DNA, la proteína IHF es requerida, aparentemente en los extremos de la IS1, para alcanzar los máximos niveles de disociación.

## BIBLIOGRAFIA

- Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts y Watson. 1983. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc.
- Bender, J. y Kleckner, M. 1986. Genetic evidence that  $\text{Trn}_{10}$  transposes by a nonreplicative mechanism. *Cell* 45: 801-815.
- Berg, D.E. 1989. Transposon  $\text{Trn}_5$ . en Mobile DNA. de Berg, D.E. y Howe, M.M. Am Soc. Microbiol.
- Birkenbihl, R.P. y Vielmetter, V. 1989. Complete maps of  $\text{IS}_1$ ,  $\text{IS}_2$ ,  $\text{IS}_3$ ,  $\text{IS}_4$ ,  $\text{IS}_5$ ,  $\text{IS}_{30}$  and  $\text{IS}_{50}$  locations in *Escherichia coli* K12. *Mol.Gen.Genet.* 220: 147-153.
- Brachet, P. Eisen, H. Rambach, A. 1970. Mutations of coliphage lambda affecting the expression of replicative functions P and O. *Mol.Gen.Genet.* 108: 266.
- Braedt, G. 1985. Recombination in *recA* Cells Between Direct Repeats of Insertion Element  $\text{IS}_1$ . *J.Bacteriol.* 162(2): 529-534.
- Braedt, G. 1988. Different Reading Frames Are Responsible for  $\text{IS}_1$ -Dependent Deletions and Recombination. *Genetics* 118: 561-570.
- Bukhasi, A.I. et al. "DNA insertion elements, plasmids and episomes" CSH laboratory 1977 pp 507-520.
- Bustos-Martínez, J.A. y Gomez-Eichelmann, M.C. 1987. Frequency of  $\text{IS}_1$ -Mediated molecular events in different members of the family enterobacteriaceae. *J.Bacteriol.* 169(11):4946-4949.
- Calos, M.P. y Miller, J.H. 1980. Molecular consequences of deletion formation mediated by transposon  $\text{Trn}_2$ . *Nature* 285: 38-41.
- Chan, P.T. y Lebowitz, J. 1982. Mapping of RNA polymerase binding sites in R12 derived plasmids carrying the replication incompatibility region and the insertion sequence  $\text{IS}_1$ . *Nucl. Acids Res.* 10: 7295-7302.
- Chandler, M. Allet, B. Galley, E. Boy de La Tour, E. y Caro, L. 1977. Involvement of  $\text{IS}_1$  in the dissociation of the r-determinant and RTF components of the plasmid R100.1. *Mol.Gen.Genet.* 153: 289-295.
- Chandler, M. Clerget, M. y Caro, L. 1980.  $\text{IS}_1$ -promoted events associated with drug-resistance plasmids. *CSH Symp.Quant.Biol.* 45: 157-165.
- Chandler, M. Séchaud, J. y Caro, L. 1982. A mutant of the plasmid R100.1 capable of producing autonomous circular forms of its resistance determinant. *Plasmid* 7: 251-262.
- Chandler, M. y Galas, D.J. 1983.  $\text{IS}_1$ -mediated tandem duplication of plasmid pBR322 dependence on *recA* and on DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 165: 183-190.
- Chandler, M y Galas, D.J. 1984. Studies on the transposition of  $\text{IS}_1$  in "Bacterial Plasmids" Ed. Helinski, D. Cohen, S. y Clewell, D. Plenum Press N.Y. :53-77
- Chernin, L.S. y Ovadis, M.I. 1980. Plasmid control recombination in *E.coli* K-12. *Mol.Gen.Genet.* 179: 399-407.
- Cohen, S.N. y Shapiro, J.A. 1980. Transposable genetic elements. *Sc.Am.* 2 (242): 40-46.
- Cornelis, G. y Saedler, H. 1980. Deletions and an inversion induced by a resident  $\text{IS}_1$  of the lactose transposon  $\text{Trn}_{951}$ . *Mol.Gen.Genet.* 178: 367-374.
- Couterier, M. Bex, F. Bregquist, P.L. y Maas, W.K. 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microb.Rev.* 52: 375-395.
- Cullum J. 1985, Insertion Sequences. in Genetics of Bacteria, Scaife, Leach y Galizzi, Academic Press.
- Datta, A.R. y Rosner, J.L. 1987. Reduced transposition in *rho* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* 169(2): 888-890.
- Darnell, Lodish, y Baltimore 1990. Molecular Cell Biology. 2nd.ed. Scientific Am Books.
- Davies, J.E. y Round, R. 1972. Transmissible multiple drug resistance in enterobacteriaceae. *Science* 176: 758-768.

- Dorman, C.J. y Higgins, C. 1987. Fimbrial phase variation in Escherichia coli: Dependence on Integration Host Factor and homologies with other site-specific recombinases. J.Bacteriol. **169**: 3840-43.
- Echols, H. 1986. Multiple DNA-protein interactions governing high-precision DNA transactions. Science **232**: 1050-1056.
- Fedorof N.V. 1989 Transposable elements in mayz. en Mobile DNA de Berg, D.E. y Howe, M.M. Am Soc. Microbiol.
- Fiant, M. Szybiski, W. y Malamy, M.H. 1972. Polar Mutations in lac, gal and Phage lambda consist of a few 18-DNA Sequences Inserted with Either Orientation. Mol.Gen.Genet. **119**: 223-231.
- Fride, P. Voelkel, K. Sternglanz, R. y Freundlich, M. 1984. Reduced expression of the isoleucine and valine enzymes in integration host factor mutants of Escherichia coli.
- Friedman, D. Olson, E. Carver, D. y Gelert, M. 1984. Synergistic effect of himA and gyrB mutations: evidence that Him functions control expression of ilv and xyl genes. J.Bacteriol. **157**(2): 484-489.
- Friedman, D. 1988. Integration host factor: a protein for all reasons. Cell **55**: 545-554.
- Galas, D. y Chandler, M. 1982. Structure and stability of Trq-mediated cointegrates. Evidence for two pathways of transposition. J.mol.Biol. **156**: 245-272.
- Galas D.J. y Smith T.F. 1984 The relationship between codo boundaries and multiple reading frame preferences: Coding organization of bacterial insertion sequences. Mol.Biol.Evol. **1**:260-268.
- Galas D.J. y Chandler M. 1989, Insertion Sequences. en Mobile DNA de Berg D.E. y Howe M.M. Am Soc. Microbiol.
- Gamas, P. Galas, D. y Chandler, M. 1985. DNA sequence at the ends of IS1 required for transposition. Nature **317**: 458-460.
- Gamas, P. Burger, A. Churchward, G. Caro, L. Galas, D. y Chandler, M. 1986. Replication of pSC101: effects on mutations in the E.coli. DNA binding protein IHF. Mol.Gen.Genet. **204** 85-89.
- Gamas, P. Caro, L. Galas, D. y Chandler, M. 1987. Expression of F transfer functions depends on the Escherichia coli integration host factor. Mol.Gen.Genet. **207**: 302-305.
- Gamas, P. y Chandler, M. 1987. Escherichia coli integration host factor binds specifically to the ends of the insertion sequence IS1 and to its major insertion hot-spot in pBR322. J.Mol.Biol. **199**: 261-272.
- Garibay, A. 1990. Influencia de la protefna HimA en la recombinación intraplasmídica. TESIS Facultad de Ciencias UNAM.
- Gellert, M.R. Menzel, K. Mizuuchi, M.H. O'Dea y Friedman, D.I. 1983. Regulation of DNA supercoiling in E.coli. CSH Symp.Quan.Biol. **47**: 763-767
- Gómez-Eichelmann, M.C. 1982. Elementos transponibles en procaríotes. Mensaje Bioquímico vol. V. UNAM. pp 75-85.
- Gómez-Eichelmann, M.C. Torres, H. 1983 Stability of plásmids R1-19 and R100 in hyper-recombinant E.coli strains and in S.typhimurium strains. J.Bacteriol. **154** : 1493-1497
- Gómez-Eichelmann, M.C. 1983 Estabilidad y expresión genética en plasmidos FII, Boiletin : 197-208.
- Greenstein, D. Zinder, N. y Horiuchi, K. 1988. Integration host factor interacts with the DNA replication enhancer of the filamentous phage φ1. PNAS USA **85**: 6262-6266.
- Grindley, M.D.F. y Sherratt, D.J. 1978. Sequence Analysis at IS1 Insertion Sites: Models for Transposition. CSHSQB **43**: 1257-1261.
- Hirsch, H.J. Starlinger, P. y Brachet, P. 1972. Two Kinds of Insertions in Bacterial Genes. Mol.Gen.Genet. **119**: 191-206.
- Hopkins, J.D. Clements, M.B. Liang, Y.T. Isberg, R.R. Y Syvanen, M. 1980. Recombination genes on the Escherichia coli sex factor specific for transposable elements. PNAS, USA **77**(5): 2814-2818.

- Isberg, R y Syvanen, M. 1981. Replicon fusion promoted by the inverted repeats of Tn5; the right repeat is an insertion sequence. *J.Mol.Biol.* **150**: 15-32.
- Johnsrud, L. 1979. DNA Sequence of IS1 A Transposable Element. *Mol.Gen.Genet.* **169**: 213-218.
- Jordan, E. Saedler, H. y Starlinger, P. 1968.  $\phi$  and strong polar mutations in the gal operon are insertions. *Mol.Gen.Genet.* **102**, 353.
- Kleckner, N. "Transposable elements in prokaryotes" *Ann. Rev. Genetic.* vol.15 1981 pp 341-404
- Krause, H. y Higgins, N. 1986. Positive and negative regulation of the Mu operator by Mu represor and Escherichia coli Integration host factor. *J.Biol.Chem.* **261**: 3744-3752.
- Lewin, B. 1990 GENES IV J. Cell Press, Cambridge Mass.
- Lüthi, K. Moser, M. Ryser, J. y Weber, H. 1990. Evidence for a role of translational frameshifting in the expression of transposition activity of the bacterial insertion element IS1. *Gene* **88**: 15-20.
- Machida, Y. Machida, CH. Ohtsubo, H. y Ohtsubo, E. 1982. Factors determining frequency of plasmid cointegration mediated by insertion sequence IS1. *PNAS.USA.* **79**: 277-281.
- Machida Y. Machida CH. y Ohtsubo E. 1984 a. Insertion Element Encodes Two Structural Genes Required for its Transposition. *J.Mol.Biol.* **177**: 229-245
- Machida CH. Machida Y. y Ohtsubo E. 1984 b. Both Inverted Repeat Sequences Located at the Ends of IS1 Provide Promoter Functions. *J.Mol.Biol.* **177**: 247-267.
- Machida, CH. Machida, Y. 1987. Base substitutions in transposable element IS1 cause DNA duplication of variable length at the target site for plasmid cointegration. *EMBO J.* **6** (6): 1799-1803.
- Machida, CH. Machida, Y. 1989. Regulation of IS1 transposition by the insA gene product. *J.Mol.Biol.* **208**: 567-574.
- Malamy, M.H. Flandt, M. y Szybalski, W 1972. Electron Microscopy of Polar Insertions in the lac Operon of E.coli. *Mol.Gen.Genet.* **119**: 207-222.
- Martínez-salazar, J. y Gómez-Eichelmann, C. 1987. Molecular rearrangements between two plasmids of the FII incompatibility group in different recombination-deficient Escherichia coli strains. *Plasmid* **18**: 237-45.
- Martínez, J.M. "Recombinación de plásmidos tipo R en E.coli K12" Tesis UNAM 1986.
- Morisato, D. y Kleckner, N. 1987. Tn10 transposition and circle formation in vitro. *Cell* **51**: 101-111.
- Murphy, E. y Lüfdahl, S. 1985. Transposition of Tn554 does not generate a target duplication. *Nature* **307**: 292-294.
- Nisioka, T. Mitani, M. y Clowes, R. 1969. Composite circular forms of R factor deoxyribonucleic acid molecules. *J.Bacteriol.* **97**(1): 376-385
- Novick, R.P. 1987 Plasmid Incompatibility. *Microbiol.rev.* **51**(4): 381 -395
- Ohtsubo, E. Zenilman, N. y Ohtsubo, H. 1980. Plasmids containing insertion elements are potential transposons. *PNAS. USA.* **77**(2): 750-754.
- Ohtsubo, E. Zenilman, N., Ohtsubo, H., McCormick, M. y Machide, C. 1980. *CSHSOB.* **45**: 283-295.
- Ohtsubo, E. Ohtsubo, H. Doroszkiewicz, W. Nyman, K. Allen, D. y Davison, D. 1984. An evolutionary analysis of iso-IS1 elements from Escherichia coli and Shigella strains. *J.Gen.Appl.Microbiol.* **30**: 359-376.
- Ohtsubo, H. Ohtsubo, E. 1978. Nucleotide sequence of an insertion element, IS1. *PNAS.USA.* **75**(2): 615-619.
- Pato, M.L. 1989 Bacteriophage Mu, en Mobile DNA de Berg, D.E. y Howe, M.M. *Am.Soc.Microbiol.*
- Peterson, B.C. y Round, R. 1983. Homologous sequences other than insertion elements can serve as recombination sites in plasmid drug resistance gene amplification. *J.Bacteriol.* **156**(1): 177-185
- Peterson, B.C. y Round, R. 1985. Recombination sites in plasmid drug resistance gene amplification.

- Prentki, P., Pham, M., Gamas, P., Chandler, M. y Galas, D. 1987. Artificial transposable elements in the study of the ends of IS1. *Gene* 61: 91-101.
- Prentki, P., Chandler, M., Galas, D.J. 1987. Escherichia coli integration host factor binds to DNA at the ends of IS1 and in an insertion hotspot with multiple IHF binding sites. *EMBO J.* 6: 2479-2487.
- Reif, H.J. y Arber, W. 1980. Analysis of transposition of IS1-Kan and its relatives. *CSHSQB.* 45: 40-43.
- Sadowski, P. 1986. Site-specific recombinases: changing patterns and doing the twist. *J.Bacteriol.* 165: 341-347.
- Saedler, H., Cornelis, G., Cullum, J., Schumacher, B. y Sommer, H. 1980. IS1-mediated DNA Rearrangements. *CSHSQB* 45: 93-98.
- Sawyer, S.A., Dykhuizen, D.E., DuBose, R.F., Green, L., Mutangadura-Mhlanga, T., Wolczyk, D.F. y Hartl, D.H. 1987. Distribution and abundance of insertion sequences among natural isolates of Escherichia coli. *Genetics* 115: 51-63.
- Scott, J.R. 1984. Regulation of plasmid replication". *Mic.Rev.*, Mar.: 1-23
- Shapiro, J.A. 1969. Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of E.coli. *J.Molec.Biol.* 40: 93.
- Sherrat, D. 1989. In3 and Related Transposable Elements: Site-Specific Recombination and transposition, en *Mobile DNA* de Berg, D.E. y Howe, M.M. *Am.Soc. Microbiol.*
- Sternglanz, R., DiNardo, S., Voelkel, K.A., Nishimura, Y., Hirota, Y., Becher, K., Zumstein, L. y Wang J.C. 1981. Mutations in the gene coding for Escherichia coli DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *PNAS USA* 78: 2747-2751.
- Syvanen, M. 1988. Bacterial Insertion Sequences, en *Genetic Recombination*, de Kucherlapati R., y Smith G.R. *Am. Soc. for Microbiol.*
- Tsal, M., Florence, Y.H. y Deonir, R.C. 1990. Intrinsic bends and integration host factor binding at F plasmid oriT. *J.Bacteriol.* 172(8): 4603-4609.
- Umeda, M., Ohtsubo, E. 1991. Four types of IS1 with differences in nucleotide sequence reside in Escherichia coli K-12 chromosome. *Gene* 98: 1-5.
- Watson, J.D. et al. "Recombinant DNA a short course" *Sci. Am. books.* 1983
- Watson, Hopkins, Roberts, Steitz y Weiner. 1987. "Molecular Biology of the Gene" Benjamin-Cummings.
- Willets, N., Clark, A. y Lois, B. 1969. Genetic localization of certain mutations conferring recombination deficiency in E.coli. *J.Bacteriol.* 97: 244-249.
- Womble, D.D. y Rownd, R. 1988. Genetic and physical map of plasmid NR1: comparison with other IncFII antibiotic resistance plasmids. *Microbiol.Rev.* 52: 433-451.
- Xu, B., Paszty, Ch. y Lurquin, P.F. 1988. A plasmid-based method to quantitate homologous recombination frequencies in gram-negative bacteria. *Biotechniques* 6(8): 752-760.
- Zerbib, D., Prentki, P., Gamas, P., Freund, E., Galas, J.D. y Chandler, M. 1990. Functional organization of the ends of IS1: specific binding site for an IS1-encoded protein.
- Zerbib, D., Polard, P., Escoubas, J.M., Galas, D. y Chandler, M. 1990. The regulatory role of the IS1-encoded InsA protein in transposition. *Mol.Microbiol.* 4(3): 471-477.