



**Universidad Tecnológica de México**

---

ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

**ESTABILIDAD DE UN PLASMIDO DE RESISTENCIA  
EN ESCHERICHIA COLI K-12**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de:

**CIRUJANO DENTISTA**

P R E S E N T A

**Haydée Kerima Torres Guerrero**

**1 9 8 0**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a la Dra. M. del Carmen Gómez Eichelmann la dirección, dedicación y estímulo para la realización de este - trabajo.

A MIS PADRES

A mis hermanas  
María Luz  
Luisa Eréndira  
Xochitl Walkiria

A  
Betsabé Yolístli

## I N D I C E

- 1) INTRODUCCION
- 2) MATERIAL Y METODOS
- 3) RESULTADOS
- 4) DISCUSION
- 5) BIBLIOGRAFIA

## INTRODUCCION

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomal, circular y superhelicoidal, cuya información genética es dispensable para la célula bacteriana huésped. Estas moléculas se encuentran en un gran número de especies de bacterias Gram-negativas (Escherichia, Salmonella, Proteus, Pseudomonas, etc.) y Gram-positivas (estafilococo, estreptococo, neumococo, etc.). A los plásmidos capaces de integrarse al cromosoma se les denomina episomas (1).

El sistema bacteria-plásmido es un sistema complejo, cuya expresión fenotípica resulta de la expresión e interacción de dos unidades de información genética: la cromosomal de la bacteria huésped y la dispensable del plásmido, por tanto, puede variar de un huésped a otro o bien en un mismo huésped en respuesta a mutaciones cromosomales o del plásmido.

El peso molecular de los plásmidos varía de  $1 \times 10^6$  a  $120 \times 10^6$  daltones, lo que representa aproximadamente de 0.1 a 1% del peso molecular del cromosoma bacteriano.

### Tipos de Plásmidos

A los plásmidos se les ha clasificado de muy diversas formas: tomando en cuenta su información genética, grupo de compatibilidad o por las características de sus sistemas de transferencia.



De acuerdo a la información genética que poseen, se les ha dividido en plásmidos tipo F, tipo Col, tipo R, etc.

El más estudiado es el factor F, encontrado originalmente en Escherichia coli K-12. Este plásmido posee información que le permite transferirse de célula a célula, así como integrarse al cromosoma de la bacteria huésped. Cuando se encuentra integrado al cromosoma, es capaz de promover la transferencia secuencial de genes cromosomales (2).

Los plásmidos Col tienen información para la producción de colicinas, proteínas capaces de matar a células bacterianas sensibles.

Los plásmidos R fueron originalmente aislados de enterobacterias durante epidemias de fiebre tifoidea y disentería (3). Posteriormente se les ha encontrado presentes en gran número de bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas. Estos plásmidos poseen información genética que, al expresarse, confiere a la célula huésped resistencia a la acción de uno o más antibióticos, agentes quimioterapéuticos y/o iones de metales pesados.

En general, la resistencia obedece a la presencia de enzimas que modifican químicamente al antibiótico, impidiendo su acción. Cuando la resistencia se debe a la información genética presente en el cromosoma, generalmente se encuentra una mutación en uno de los genes que codifican para la síntesis de una macromolécula involucrada en la replicación del ADN, transcripción o traducción del mensaje genético. Esta macromolécula es el sitio donde actúa el antibiótico, bloqueando su función.

En el caso de la estreptomicina, que es un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas en bacterias, la resistencia conferida por un plásmido, obedece a la presencia de enzimas que acetilan o fosforilan al antibiótico inactivándolo biológicamente (4). La resistencia cromosómica, por otra parte, obedece generalmente a una mutación en el gene rpsL(strA) que altera la estructura de una proteína de la subunidad ribosomal 30S, impidiendo la unión estreptomicina-ribosoma y por tanto la acción del antibiótico (5).

Otros plásmidos poseen información variada, como los plásmidos Ti, cuyos productos son inductores de tumores en plantas; los plásmidos Ent que codifican para enterotoxinas, etc.

### Fisiología de los Plásmidos

#### a) Conjugación

Los plásmidos pueden también clasificarse de acuerdo a su capacidad para transferirse a otras células. A este proceso de transferencia de material genético de una célula (donadora) a otra célula (receptora) se le denomina conjugación. Para que la conjugación se lleve a cabo, la célula donadora y la receptora deben estar en contacto formando un puente conjugativo. Este puente está constituido por el pilus sexual de la célula donadora y una proteína membranar específica de la célula receptora. El ADN es transferido a través de ese puente (6). Únicamente una cadena de ADN es transferida y tanto la célula receptora como la donadora sintetizan la comple

mentaria correspondiente (7).

La transferencia de material genético requiere la presencia y expresión del operón tra. Este operón está constituido por aproximadamente 12 genes regulados por el producto del gene traJ (8). La expresión del operón tra determina la síntesis y ensamble de los pili sexuales, así como la transferencia de material genético (9). No todos los plásmidos poseen la información genética para transferirse por conjugación a otras células. Esto ha permitido clasificarlos en dos grupos: Plásmidos conjugativos y no-conjugativos. La mayoría de los plásmidos no-conjugativos son de peso molecular menor a  $20 \times 10^6$  daltones, mientras que la mayoría de los conjugativos son de peso molecular superior a  $20 \times 10^6$  daltones. Sin embargo, en la naturaleza es frecuente encontrar plásmidos grandes, no-conjugativos principalmente tipo R. Estos plásmidos contienen al operón de transferencia pero su expresión fenotípica se encuentra reprimida. Los plásmidos conjugativos a su vez se clasifican de acuerdo a su sistema de transferencia. Se han descrito cuatro sistemas de transferencia: El sistema tipo F, tipo I, tipo N y tipo P. Cada uno de estos sistemas codifica para un tipo diferente de pilus sexual. Estos pili son receptores específicos de ciertos fagos, lo que facilita su identificación. Por ejemplo, los pili F son receptores de fagos de RNA como R17, MS2 y QB; los pili I de fagos de ADN de una cadena como I1 y I2 los N, que son al parecer pili muy pequeños, son receptores del fago IKE y los P de los fagos de ARN,

PRRI y PRDI.

b) Estabilidad:

Es la capacidad de un plásmido de replicarse en forma estable en la célula huésped en ausencia de presión selectiva.

Esta estabilidad puede ser afectada por varios factores. Uno de ellos, es el fenómeno de incompatibilidad que puede presentarse al transferirse un segundo plásmido a una bacteria. Cuando los dos plásmidos son similares en una región del genoma, no son capaces de coexistir establemente, segregándose generalmente el segundo plásmido.

La estabilidad de un plásmido puede verse también afectada si la bacteria huésped es expuesta a dosis subletales de compuestos químicos como naranja de acridina, bromuro de etidio, ácido nalidíxico, rifamicina, etc. A la eliminación de un plásmido por tratamiento de la célula huésped con sustancias químicas, se le denomina curación (10).

Plásmidos tipo "R"

A la fecha se han aislado y caracterizado un gran número de plásmidos R que se diferencian entre sí por ciertas propiedades: Peso molecular, número de copias por cromosoma, patrón de resistencia, posibilidad de integrarse al cromosoma, capacidad de transferirse, compatibili

dad con otros plásmidos, estabilidad, etc.

La mayoría de estos plásmidos se encuentran constituidos por dos unidades funcionalmente distinguibles: el componente conjugativo del plásmido (CCP ó RTF) que posee la información genética para la transferencia, propiedades de incompatibilidad y replicación, y la región donde se localizan los genes que confieren la resistencia a antibióticos (r-det). La estabilidad de estas dos unidades varía según el huésped bacteriano.

En Escherichia coli, el CCP y r-det se mantienen establemente asociados formando una sola molécula, la cual segrega a los genes de resistencia con muy baja frecuencia (11). En Salmonella typhimurium los plásmidos R tipo fi+ (plásmidos cuya información genética es capaz de reprimir la expresión del operón de transferencia del plásmido F) son genéticamente inestables, perdiéndose todo el plásmido R ó únicamente la región r-det (11). En Proteus mirabilis al comportamiento de las dos unidades de los plásmidos R es más complejo. La estructura y composición molecular del plásmido depende de la presencia o ausencia de antibiótico en el medio. En presencia de cloramfenicol se seleccionan bacterias con plásmidos que presentan un número mayor de copias de la región r-det sin presentarse un aumento paralelo en el número de unidades CCP (12).

Las moléculas de ADN de los plásmidos R al igual que el ADN cromosómico, de fagos u otros plásmidos, puede contener además ciertas secuencias específicas de nucleótidos llamadas secuencias de inserción

(IS), secuencias repetidas invertidas (IR) y transposones (Tn). Las secuencias de inserción están formadas de 800 - 4000 pares de nucleótidos y son capaces de transponerse a diferentes regiones del plásmido o del cromosoma. Estas secuencias al insertarse en operones producen mutaciones fuertemente polares (disminuyen la expresión genética del gene donde se insertan así como la de todos los genes del operón distales al sitio de dicha inserción). Las secuencias invertidas son segmentos de ADN -- cuya secuencia de nucleótidos está duplicada y en sentido inverso. Estas secuencias, en general, se encuentran en los extremos de las secuencias de inserción y de los transposones. Un transposón es una unidad de información que contiene varios genes (frecuentemente genes de resistencia a antibióticos) y que es capaz de transponerse a otro plásmido y con frecuencia menor al cromosoma (13). Además de su capacidad de transponerse, las IS y los Tn son capaces de inducir mutaciones por delección de las regiones de ADN vecinas a su localización (14).

La transposición de estas secuencias no depende del sistema de recombinación rec (15), sino de un sistema de recombinación, denominado ilegítimo, aún no definido genética y molecularmente.

En los plásmidos R que han sido estudiados molecularmente, se ha encontrado que el CCP y el r-det están separados por secuencias de inserción (16).

PROYECTO DE INVESTIGACION

El interés de este proyecto de investigación se centró en los factores que pueden influir en la estabilidad de un plásmido en la célula huésped. Dentro de este interés se encuentra el fenómeno de curación, -- que se define como la eliminación inducida del plásmido por agentes químicos (10). Para explicar este fenómeno se han propuesto 4 hipótesis:

- a) Interferencia con el mecanismo de replicación del plásmido (17, 18).
- b) Interferencia con el mecanismo de segregación de las células hijas.
- c) Selección de células que espontáneamente han perdido el plásmido (19).
- d) Inducción y selección de mutantes  $R^-$ .

El fenómeno de curación es explicado por varios autores como la interferencia del compuesto químico con la replicación del plásmido, pero sus datos generalmente podrían explicarse también, como una selección de células  $R^-$  que serían más resistentes al compuesto utilizado.

En este proyecto se trató de comprender en forma más precisa este fenómeno; para ello se utilizaron cepas bacterianas bien caracterizadas, el compuesto bromuro de etidio del cual se conoce su forma de acción en el ADN y el plásmido RI-19 que ya ha sido estudiado genética y molecularmente. Este plásmido es una mutante derreprimida de RI, se encuentra constituido por el componente conjugativo del plásmido (CCP) y por el -

determinante de resistencia a antibióticos, que le confiere a la bacteria resistencia a: cloramfenicol, espectinomicina-estreptomicina, ampicilina, kanamicina-neomicina y sulfadiacina. El peso molecular de este plásmido es de 65.5 millones de daltones (20). En la fase inicial se estudió el comportamiento de las bacterias huésped al contener a RI-19.

Este estudio tomó en consideración los siguientes hechos:

- a) La presencia de un plásmido puede alterar el tiempo de generación de su célula huésped (21).
- b) La sensibilidad a las acridinas varía importantemente de una cepa de E. coli a otra (22).
- c) Algunos plásmidos modifican la sensibilidad de las células a varias acridinas o pueden afectar la mutabilidad espontánea de la bacteria huésped.

En base a lo anterior y para definir el sistema E. coli/RI-19 se estudiaron los siguientes parámetros en las células  $R^-$ ,  $R^+$ :

- a) Tiempo de generación
- b) Sensibilidad a bromuro de etidio
- c) Mutabilidad espontánea
- d) Estabilidad espontánea

El estudio de estos parámetros permitió establecer las condiciones adecuadas para efectuar los experimentos de curación y ayudó a una mejor interpretación de los resultados.



Otra parte importante del proyecto fué el estudio de la influencia de mutaciones cromosomales en la estabilidad de RI-19.

Se sabe que existen dos sistemas que modifican el ADN.

Una metilasa que es el producto del gene hsdM evitando con ésto la "restricción" (degradación) del ADN por la endonucleasa III. Este sistema es importante ya que reconoce al ADN que proviene de diferentes sistemas de modificación-restricción degradándolo y evitando su permanencia estable en la célula huésped. Las adeninas metiladas por este sistema equivalen al 1-3% del total.

E. coli K-12 posee otra metilasa para adenina en la secuencia-GATC-codificada por el gene dam. La metilación determinada por esta enzima constituye aproximadamente el 85% del total de adeninas metiladas. La función de esta metilación no se conoce bien por lo que se consideró importante estudiar si influía o no en la estabilidad de los plásmidos. Para ello se eligió una cepa de E. coli portadora de la mutación dam-3. El cromosoma de esta mutante no tiene metiladas las adeninas de las secuencias -GATC-. El fenotipo de estas células es:

- a) Incremento en sensibilidad a luz UV y metilmetano sulfonato y
- b) Mayor mutabilidad espontánea.

Además su ADN presenta un número mayor de cortes en una cadena (23). Considerando este efecto secundario a la hipometilación, se eligió una cepa control, con una metilación en adenina normal pero con -

un mayor número de cortes de una cadena en su ADN. Esto permite conocer si un posible efecto de dam-3 sobre la estabilidad de RI-19 se debe a -- hipometilación o a la presencia de los cortes en el ADN, secundarios a dicha hipometilación. Como control se eligió una cepa portadora de la mutación amber polAI (24). El gene polA codifica para la polimerasa I. Las células deficientes en polI (como la mutante polAI) presentan una capacidad disminuída en la reparación del ADN lo que ocasiona la presencia de un número mayor de cortes de una cadena en el ADN.

El estudio de estas mutaciones cromosomales - dam-3 y polAI - nos permitirá además saber si el comportamiento de RI-19 en bacterias de E. coli K-12 cuyo ADN presenta mayor número de cortes y por lo cual la -- recombinación se ve incrementada, es similar al comportamiento del plásmido en Salmonella typhimurium. Se ha descrito que en S. typhimurium el - plásmido se disocia en el CCP y el r-det (11) tal vez por un evento de recombinación dependiente de rec a nivel de las dos ISI que flanquean al -- r-det (Fig. 1). Ya que el r-det no es un replicón independiente (25) las células resultantes únicamente retienen el CCP. Con ésto podríamos determinar si los sistemas de recombinación en estas dos especies son diferentes y si el incremento en recombinación en E. coli reproduce lo descrito para S. typhimurium. Con los resultados obtenidos se tratará de explicar el fenómeno de la curación, así como de conocer la influencia de algunas mutaciones cromosomales en la estabilidad de un plásmido.

MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y fagos

Las cepas bacterianas, plásmidos y fagos utilizados en este trabajo se enumeran en la Tabla I.

Medios de cultivo

- 1) Medio Luria. Bacto Triptona 10 gr., extracto de levadura 5 gr., cloruro de sodio 10 gr., agar 20 gr., agua destilada a 1000 ml. El pH se ajustó a 7.2 con NaOH 2.5 N.
- 2) Medio Fry. Extracto de carne 10 gr., Bacto peptona 5 gr., cloruro de sodio 10 gr., agar 14 gr., agua destilada a 1000 ml.
- 3) Medio Mínimo. Cloruro de amonio 1 gr., fosfato de potasio 3 gr., cloruro de sodio 0.5 gr., fosfato de sodio 6 gr., sulfato de magnesio 0.25 gr., agua desionizada a 1000 ml. Los aminoácidos requeridos se adicionaron a una concentración final de 20 µg/ml. La vitamina B1 se agregó a una concentración final de 1 µg/ml.
- 4) Antibióticos Cuando se adicionaron antibióticos a los medios de cultivo, las concentraciones finales fueron: -

Acido nalidíxico 25 µg, ampicilina 25 µg, cloram  
fenicol 25 µg, estreptomicina 50 µg, kanamicina  
25 µg, rifampicina 10 µg.

- 5) Agar blando      Bacto agar 7 gr., cloruro de sodio 8 gr., caldo  
Luria 30 ml., agua desionizada a 1000 ml.

Amortiguadores

- 1) Amortiguador      0.1 M Trizma base, 0.001 M Ac. etilendiaminote--  
TE                    tracético (sal tetrasódica) EDTA, pH 8.0. El pH  
se ajustó con ácido acético glacial.
- 2) Amortiguador BA   0.05M Trizma base, 0.02 M acetato de sodio, --  
                         0.002 M EDTA, 0.018 M cloruro de sodio. Se ajus  
tó el pH a 8.05 con ácido acético glacial.
- 3) Amortiguador      90 mM Trizma base, 2.5 mM EDTA disodico, 90 mM -  
Borato                ácido bórico, pH 8.2.
- 4) Amortiguador      10 mM de Tris-HCl, 75 mM NaCl, 10 mM Mg.Cl<sub>2</sub>, 1 mM  
Mbo I                ditriotreitól, pH 7.2.

REACTIVOS

Agarosa para electroforesis (Sigma), Azul de bromofenol --  
(Merck), Bromuro de etidio (Sigma), Glicerol (Baker), Trizma (Sigma), --  
EDTA (Sigma), Persulfato de amonio (BioRad) TEMED (BioRad), Acrilamida -

(BioRad), Acido bórico (Merck), Metil metano sulfonato (Eastman Kodak).

#### METODOS

- 1) En la mayoría de los experimentos realizados se utilizaron cultivos bacterianos en fase exponencial. La cepa requerida se sembró en 5 ml de caldo Luria y se incubó a 37° C durante 18 hrs; - se inoculó 0.2 ml de este cultivo en un matraz nefelométrico con 10 ml de caldo Luria y se incubó a 37°C con agitación. Se realizaron lecturas periódicas a una D.O. de 550 nm, en un fotocolorímetro Bauch and Lomb Spectronic 20.
- 2) Métodos de siembra en medio sólido.
  - a) Siembra por estría. Se estría una colonia en medio de cultivo sólido, de éste se toma nuevamente una colonia. Este procedimiento se repite 2 veces para tener una población homogénea de colonias.
  - b) Siembra por vaciado. A tubos con 3 ml de agar blando licuado, se añadió 0.1 ml del cultivo, se agitó y vació en medio sólido, distribuyéndolo uniformemente; se incubó ya solidificado a 37°.
  - c) Método de parchado y de réplica en caja. Este método es utilizado cuando se desean probar los marcadores genéticos - de gran cantidad de clonas. Consiste en tomar colonias ais-

ladas con palillos estériles y sembrarlas ordenadamente en medio sólido. Se incuban a 37°C durante 8-10 hrs. y se replican en los diferentes medios a probar, utilizando para ello un terciopelo estéril en donde se imprimen los parches para después transferirlos a los medios correspondientes. Se incuban las cajas a 37°C y se analizan (26).

- 4) Purificación y conservación de las cepas. Se estirió una colonia en un medio de cultivo apropiado, a partir de éste se tomó una colonia y se estirió nuevamente. Este procedimiento permite una población bacteriana homogénea, se conservan a 4°C. También se conservan a -20°C con 40% de glicerol a temperatura ambiente sembradas por piquete en tubitos con 2 ml de medio Luria sólido.
- 5) Selección de mutantes espontáneas resistentes al ácido nalidíxico o a rifampicina. A un tubo de agar licuado se le añadió 0.1 ml de un cultivo bacteriano con aproximadamente  $5 \times 10^8$  -  $1 \times 10^9$  células/ml; se agitó y vació en el medio de selección ya sea con ácido nalidíxico y rifampicina. Se incubó de 24 a 48 horas a 37°C.
- 6) Propagación del fago R-17. En 25 ml de caldo Luria se inoculó 2.5 ml de un cultivo de la cepa sensible, se agregó cloruro de calcio a una concentración final de 5 mM.

El cultivo se creció hasta la fase exponencial y en este momento se agregó una placa de fago. Se incubó a 37°C de

5 - 6 hrs. Se añadieron unas gotas de cloroformo y se centrifugó. El fago es conservado a 4°C (27).

- 7) Sensibilidad al fago R17. En medio Fry se sembró por vaciado 0.1 ml del cultivo bacteriano; al haber solidificado se agregó 0.05 - 0.1 ml de la solución del fago. Se incubó a 37°C (28).
- 8) Conjugación. En 2 matraces nefelométricos con 10 ml de caldo Luria cada uno se inoculó 0.1 ml del cultivo de la cepa donadora en el primer matraz y 0.1 ml de la receptora en el otro matraz, se incubaron a 37°C hasta una densidad óptica de 0.2U a 550 nm ( $1 \times 10^8$  células). La mezcla de conjugación se realizó en la siguiente proporción: 4.5 ml de la cepa donadora y 0.5 ml de la receptora. Se incubó a 37°C sin agitación durante 30 min. Se diluyó y sembró en el medio de selección.
- 9) Sensibilidad a bromuro de etidio. Se utilizaron dosis subletales de bromuro de etidio (3 - 100 µg/ml), un inóculo de  $1 \times 10^2$  -  $1 \times 10^3$  células/ml y un tiempo de incubación de 6 hrs. A tubos con 5 ml de medio Luria y tubos con diferentes concentraciones de bromuro de etidio, se les añadió 0.1 ml del cultivo. Se incubó a 37°C durante 6 hrs. y se realizaron cuentas viables.

- 10) Curación. Las dosis de bromuro de etidio elegidas fueron -- aquellas que permitieron un 50% de sobrevivencia. Para efec --  
tuar la curación se siguió el protocolo de sensibilidad a --  
bromuro de etidio, se dejó incubando 18 hrs. y se sembró ---  
por estria en el medio adecuado. Se incubaron 18 hrs. a --  
37°C. Las colonias se parcharon y replicaron en medios con  
diferentes antibióticos.
  
- 11) Sensibilidad a metil metano sulfonato. A 10 ml de caldo --  
Luria se agregaron 4  $\mu$ l de metil metano sulfonato. En tubos  
pequeños se colocaron 2 ml de la mezcla anterior y se inocu-  
laron con 0.1 ml de la cepa a probar. Se incubó a 37°C por  
12-16 hrs.
  
- 12) Transformación. La extracción y purificación del ADN de --  
plásmido se hizo conforme al método descrito por Betlach et  
al (1976) (29) en el cual el ADN después de ser precipitado  
con etanol, se cromatografía en una columna de Bio-gel y se  
centrifuga en un gradiente de cloruro de cesio a 38,000 rpm  
durante 42 hrs.  
  
Las bacterias se hacen competentes para la transformación --  
tratándolas con altas concentraciones de cloruro de calcio,  
y se incuban con aproximadamente 4  $\mu$ g de ADN purificado --  
(30).



- 13) Obtención de ADN de plásmido. La bacteria se creció hasta llegar a fase exponencial. El cultivo se centrifugó durante 10 min. y la pastilla se resuspendió en 0.25 ml de TE.

A esta suspensión se añadió:

1. 0.005 ml de NaOH 1.0M y se incubó 15 min. a temperatura ambiente.
2. 0.005 ml de SDS 10% (se incubó 10 min.).
3. 0.005 ml de solución neutralizadora (0.2 M Trizma base y 1.8M Trizma HCl).

Los lisados se incubaron en un baño a 40 - 50°C, durante 4 - hrs. y posteriormente se incubaron a -20° por 12 - 16 hrs -- La fase viscosa del lisado se separó de la fase fluída por decantación. La fase fluída fué utilizada para visualizar el ADN del plásmido por electroforesis en geles de agarosa.

- 14) Obtención del ADN total. La cepa bacteriana se creció en -- 3 ml de medio cerebro-corazón durante 18 hrs. Este cultivo se centrifugó durante 5 min. La pastilla se resuspendió en una solución de Sacarosa 25% en Tris-HCl 50 mM, a esta solución se agregaron los siguientes reactivos: 0.04 ml de EDTA 0.25 M, pH 8.0, se incubó 5 min; lisozima 0.05 mg/ml, se -- incubó 10 min. en hielo; RNAasa a 0.01 mg/ml, 150 ul de mezcla lítica (3 ml de Triton X-100 al 10% 75 ml de EDTA 0.25 M, 15 ml de Tris-HCl 1M, pH 8, 7 ml de H<sub>2</sub>O) y se incubó 10 min, finalmente se agregaron 200 ul de agua.

agua.

Esta solución se centrifugó 4 min. a 10.000 rpm, se separó la fase superior acuosa y se extrajo con fenol (saturado con -- amortiguador: una mezcla 1:1 de fenol destilado sobre zinc, y Tris HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5) y luego con fenol-cloroformo (1:9 v/v), el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol a -20°C.

El ADN así obtenido se utilizó para las digestiones con la -- enzima MboI.

- 15) Digestión con MboI. A 45  $\mu$ l de amortiguador de MboI se añaa-- dieron 5  $\mu$ l de ADN total (2-3  $\mu$ g DNA) y 4  $\mu$ l de enzima. La reacción se incubó 18 hrs. a 37°C y se detuvo al agregar 10  $\mu$ l de urea a una concentración 10 mM conteniendo 0.05% de azul de bromofenol. Esta muestra se analizó por electroforesis en gel de acrilamida.
  
- 16) Electroforesis en geles de agarosa. Se preparó agarosa al -- 0.8% en amortiguador BA IX, se vació en tubos de vidrio de -- 13 cm x 6 mm y se espero a que gelifique la agarosa, aproxima-- damente 1 hr. Los tubos se colocaron en la cámara de electro-- foresis y se añadió el amortiguador BA IX. En los tubos se -- colocó la muestra de ADN previamente teñida con azul de bromo-- fenol al .05% y glicerol 10-20%.

La electroforesis se corrió a 40 volts constantes hasta que -- el colorante llegó al extremo terminal del gel. Los geles se -- tñieron con una solución de bromuro de etidio a una concentra--

ción de 10  $\mu$ g/ml; para visualizarlos se empleó un transiluminador de onda corta de U.V.; la fotografía se tomó con una cámara MP-3, película tipo 55 Polaroid y un filtro amarillo No. 9 Kodak.

- 17) Electroforesis en geles de acrilamida. Se preparó acrilamida al 7.3% - bisacrilamida 0.2%. La electroforesis se -- corrió en un amortiguador de Tris - EDTA - Ac bórico a 200 volts por 1 hr. (31). Los geles se tiñeron con bromuro de -- etidio y se fotografiaron como se describió.

#### RESULTADOS

La realización de nuestros experimentos requirió de cepas -- portadoras de los diferentes plásmidos. El método utilizado para la -- transferencia de RI-19 y Fkm fué conjugación. Con este método se obtu-- vieron las cepas GM110/RI-19, GM111/RI-19, W3110/RI-19, W3111/RI-19, -- KTOI/RI-19, JM1452/RI-19, W3110/Fkm y GM33/Fkm. Las transconjugantes -- fueron seleccionadas en medios apropiados y probadas en los diferentes -- medios con antibiótico. Se verificó la presencia del plásmido por medio de electroforesis en geles de agarosa y por la sensibilidad al fago R17.

#### OBTENCION DE LA CEPA KTOI

Esta cepa fué construída a partir de la W3110, la cual pri-- mero se hizo Thy<sup>-</sup>, para que al conjugarla por la cepa Hfr se pudiera --

seleccionar el gene recA que cotransfiere en 86% con el de timina. La mutación Thy<sup>-</sup> se indujo con trimetoprima, compuesto que inhibe la timidilato reductasa que es la enzima encargada del paso de deoxi-uridilato monofosfato a timidina monofosfato (35). La cepa se creció en medio mínimo completo más trimetoprima a una concentración de 1 µg/ml. Las mutantes fueron seleccionadas en medios con 50 µg/ml de timina y probadas para su incapacidad de crecer en medios sin timina. Una de las mutantes fué purificada y utilizada como receptora del gene recA. La cepa JC5088 se conjugó por la cepa W3110 Thy<sup>-</sup> durante 30 min., se sembró y seleccionó en medios sin timina.

Las cepas capaces de crecer sin timina fueron probadas en cuanto a su sensibilidad a luz U.V. (36) y a nitrofurantoina (37); aquellas que mostraron incremento en la sensibilidad, tanto a U.V. como a nitrofurantoina, fueron purificadas y utilizadas en los experimentos.

El fenotipo de la mutante construída es Thy<sup>+</sup> RecA<sup>-</sup>.

#### COMPROBACION DEL FENOTIPO DE LAS CEPAS W3111, GMIII y KTOI AL PORTAR A RI-19

Para asegurarnos de que el fenotipo de nuestras mutantes polIAI y dam-3 no se veía modificado por la transferencia de RI-19, probamos nuestras cepas por diferentes métodos.

La cepa W3111/RI-19 fué analizada para polA como se indica en Métodos por su sensibilidad a metil metano sulfonato, la cepa GMIII/RI-19 se analizó, realizando una digestión con la enzima Mbo I que reco-

noce y corta en la secuencia 5-GATC-3 del ADN no metilado (Fig. 1). En la cepa KTOI/RI-19 se probó la sensibilidad incrementada a luz U.V. y a nitrofurantoina.

Los datos que obtuvimos es que RI-19 no modifica el fenotipo de ninguna de nuestras mutantes, lo que indica que no tiene genes que -- codifiquen para proteínas similares a la polimerasa I, metilasa de adenina o enzima de recombinación.

#### PARAMETROS MEDIDOS

El comportamiento de las células al transferirle RI-19 es -- importante para lograr establecer condiciones adecuadas para diferentes experimentos, así como para lograr una mejor interpretación de los resultados obtenidos. Para ésto se midió en células  $R^+$  y  $R^-$  el tiempo de --- generación, mutabilidad espontánea, sensibilidad a bromuro de etidio y -- estabilidad espontánea. El tiempo de generación y la mutabilidad espontánea en las cepas no varió estimativamente con respecto a las células -- sin plásmido (Tabla II y III). La sensibilidad a bromuro de etidio en las células  $R^+$ , se vió ligeramente incrementada con respecto a las que no -- tienen plásmido; el incremento en sensibilidad es de aproximadamente --- 1.5 -2 veces (Gráfica 1).

Los resultados en estabilidad espontánea se encuentran repre sentados en la Gráfica 11. Este experimento se hizo subcultivando duran te siete días a las bacterias en caldo Luria sin presión selectiva. Se

analizaron las poblaciones en cuanto a aparición de multisensibles en los días 1, 3, 5, 7.

En la cepa GM110 el plásmido se replica establemente y el 100% de las células son multiresistentes, en la cepa KTO1 100% de las células replican establemente al plásmido y no encontramos células multisensibles, la cepa W3110 presenta ligera inestabilidad del plásmido y para el séptimo día encontramos 25% de multisensibles.

En aproximadamente el 15% de las cepas encontramos segregación de los marcadores de resistencia. Por un lado se perdía la resistencia a cloramfenicol que invariablemente iba acompañada por la pérdida de la resistencia a espectinomicina y por el otro lado había pérdida de la resistencia a kanamicina que en ocasiones iba acompañada de ampicilina.

#### ANÁLISIS DE LAS CELULAS MULTISENSIBLES DERIVADAS DE LAS CEPAS dam-3 y - polA

Para analizar si el plásmido había sido perdido parcial o totalmente, en las cepas multisensibles utilizamos el método de sensibilidad a RI7, encontrándose que aproximadamente el 95% de éstas fueron sensibles al fago. Para verificar molecularmente la presencia del plásmido en estas cepas multisensibles se corrió una electroforesis en gel de agarosa, y se encontró una molécula más pequeña que RI-19 de aproximadamente 40 millones de daltones que corresponde al CCP (20) (Fig. 2). Con esto concluimos que únicamente se perdió el r-det y que el CCP se mantiene

establemente en las cepas dam-3 y polAI.

#### FRECUENCIA DE TRANSPOSICIÓN

Debido a que el fenómeno a nivel de IS se ve incrementado en cepas que hiperrecombinan quisimos ver si el fenómeno de transposición - también se veía alterado.

Este experimento no se pudo realizar en la cepa polAI porque los plásmidos derivados de CoIEI no se replican en estas células. El experimento, se realizó en la cepa GM33/FKm y como control se utilizó a la cepa W3110/FKm. Estas cepas fueron transformadas con pMB8::Tn3. Las transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a kanamicina y ampicilina, una de las transformantes fué purificada y utilizada para transposición. El cultivo se incubó a 30°C sin agitación durante 24 hrs. (38), ya incubadas se conjugaron por la cepa W3111 para eliminar el plásmido pequeño.

La selección se hizo en medios con kanamicina y con kanamicina más ampicilina.

En estas condiciones y con nuestras cepas no encontramos un cambio significativo en el fenómeno de transposición (Tabla IV).

#### FRECUENCIA DE CURACION

Las condiciones para este experimento fueron establecidas por los resultados obtenidos en los experimentos de sensibilidad a bromuro de

etidio y fueron realizados como se indica en Métodos.

Las concentraciones de bromuro de etidio utilizadas fueron aquellas que dieron un 50% de sobrevivida, una concentración dos veces mayor y una dos veces menor, el objetivo de ésto es cubrir un rango amplio basado en la sensibilidad.

Para las cepas GM110/RI-19, JMI452/RI-19 y W31110/RI-19 -- utilizamos concentración de 30, 60 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio y - para las mutantes W3111/RI-19, GM33/RI-19 y GM111/RI-19 concentraciones de 15, 30 y 60  $\mu\text{g/ml}$  del compuesto. Después de 18 hrs. de incubación - fueron analizadas las diferentes poblaciones en cuanto a pérdida de resistencia antibiótico. Encontramos que RI-19 en un plásmido que se replica establemente aún con el tratamiento con bromuro de etidio, ya que no encontramos segregación de marcadores de resistencia o aparición de - cepas multisensibles. Por lo que podemos concluir que RI-19 no es cura ble en estas condiciones.



## DISCUSION

El estudio de la estabilidad de un plásmido requiere del -- conocimiento de la influencia de este plásmido en el comportamiento de la célula huésped, ya que se ha descrito que ciertos plásmidos modifi-- can funciones como: tiempo de generación, sensibilidad a ciertos com-- puestos, mutabilidad espontánea, etc. Para este estudio elegimos cua-- tro parámetros (tiempo de generación, mutabilidad espontánea, sensibili-- dad a bromuro de etidio y estabilidad espontánea) que nos ayudaron a -- conocer el comportamiento de la célula al portar a RI-19 y observar si las células  $R^-$  tienen ventaja selectiva con respecto a las  $R^+$ .

Los resultados nos muestran que el tiempo de generación y - mutabilidad espontánea varían de cepa a cepa y que al introducir RI-19 estos parámetros no se ven modificados considerablemente, por lo que -- estos parámetros no actúan como factores de selección entre las bacte-- rias  $R^-$  y  $R^+$ . La sensibilidad a bromuro de etidio se incrementó de 1.5 2 veces en las células  $R^+$  y no sabemos si actue como factor de selección debido a que el incremento es pequeño y la viabilidad de ambas poblacio-- nes al tratarlas con este compuesto es similar.

No se sabe porque al introducir un plásmido, la sensibilidad a ciertos compuestos se ve incrementada, pero tal vez la síntesis del - pili y su ensamble modifique la superficie externa de la bacteria y de alguna manera se permita la entrada de mayor número de moléculas del -- compuesto.

El siguiente parámetro estudiado fué la estabilidad espontánea de RI-19. Lo que encontramos es que en la cepa GM10 cuyo cromosoma está íntegro, el plásmido se replica establemente al subcultivarlo - sin presión selectiva durante siete días. Al no encontrar pérdida o segregación de los marcadores se pensó en inestabilizar a RI-19 con mutaciones cromosómicas. Como se sabe que el sistema de modificación-resistencia es importante para el establecimiento del plásmido en la célula huésped, quisimos ver que sucedía con el sistema de dam cuya función no es bien conocida. Para determinar si la estabilidad del plásmido se debía a metilación o a los cortes presentes en la cepa dam-3 se puso como control a la cepa polAI que presenta una metilación normal, pero también presenta cortes en el ADN. Lo que se encontró en estas mutantes, fué la aparición de dos poblaciones de células. La población mayor que equivale al 50-80% de las células, presentan un fenotipo de sensibilidad a: kanamicina, ampicilina, estreptomycin-espectinomicina y cloramfenicol (Gráfica I) y la población menor de 10-15% presentan sensibilidad a cloramfenicol, estreptomycin-espectinomicina o kanamicina o kanamicina-ampicilina.

Primero trataremos de explicar la presencia de células multisensibles y para ello nos apoyaremos en lo descrito por L. Caro (25). Debido a que RI-19 presenta dos ISI flanqueando al r-det, puede existir recombinación por homología dependiente de recA (16) entre estas dos secuencias (Fig. 3). Al recombinar estas dos estructuras parece ser que todo el r-det se separa del CCP, quedando dos moléculas en la bacte

ria cada una con un ISI. Ya que no se han podido aislar las moléculas del r-det replicándose en forma autónoma, al disociarse el plásmido únicamente, se conserva el CCP (Fig. 3).

Quisimos ver si esto sucedía en nuestro sistema, lo primero fué probar las cepas multisensibles para sensibilidad al fago R17, encontrando que el 95% de las cepas probadas eran sensibles al fago, esto indica que sigue habiendo síntesis de pili tipo F que son receptores específicos del fago. Para comprobar molecularmente este dato, se hicieron lisados claros de cepas multisensibles R17 sensibles, poniendo como control una cepa sin plásmido, una con RI-19 y un marcador del peso aproximado del CCP que fue el plásmido RP4.

El resultado se muestra en la Figura 2 donde en los dos últimos carriles aparece una molécula de peso molecular aproximado al RP4, esta molécula corresponde al CCP.

Nosotros apoyamos el que la recombinación a nivel de ISI es un evento dependiente de recA. Este sistema de recombinación es denominado "legítimo" y en un proceso muy complejo en el cual intervienen gran cantidad de productos pero el más importante para recombinación es el -- producto del gene recA.

Para lograr disecar si el fenómeno que observamos en las mutantes polAI y dam-3 es un fenómeno dependiente de recA, se construyó la cepa KTOI a partir de la cepa W3110. Se escogió esta cepa porque a pesar de ser "silvestre" el plásmido se inestabiliza ligeramente al subcul

tivarla los 7 días (Gráfica II), produciendo de 10-20% de multisensibles. Esta mutante no se construyó a partir de polAI a dam-3 porque la doble mutante es letal (39).

Al subcultivar a la cepa KTOI/RI-19 sin presión selectiva se encontró que el porcentaje de multisensibles desaparece, logrando una total estabilidad del plásmido. Este dato apoya que recA es responsable de la recombinación a nivel de las ISI.

Este fenómeno de disociación del plásmido encontrado por nosotros en E. coli K12 ya ha sido descrito para S. typhimurium (11), en el cual RI-19 se disocia y únicamente replica establemente al CCP. Pero al hacerla recA el plásmido se estabiliza.

Con estos datos en E. coli y con el conocimiento de lo que sucede en S. typhimurium proponemos que el sistema de recombinación de estas dos bacterias es diferente, ya que se requiere de mutantes que hiperrecombinen en E. coli para producir lo que sucede en S. typhimurium normalmente. Tal vez el sistema de recombinación de E. coli es menos activo que el de S. typhimurium.

En cuanto a la población menor encontrada, tenemos 3 tipos de segregantes:  $Cm^S$   $Spc^S$   $Str^S$ ,  $Km^S$ ,  $Km^S$   $Ap^S$ . Para explicar eso nos basamos en lo que se conoce de las ISI ya que RI-19 tiene dos ISI flanqueando al r-det (Fig. 4).

Se ha descrito que las ISI causan deleciones, y que estas son dependientes de la dirección de la secuencia (40).

En RI-19, una de estas secuencias se encuentra próxima al - gene cat (Cm) y seguido a este gene se encuentra aad (Spc-Str); la dele- ción a partir de este ISI abarca ambos genes, produciendo con esto una célula sensible a cloramfenicol, espectomicina y estreptomicina. En el otro extremo del r-det se encuentra el segundo ISI próximo al gene de - kanamicina. Este ISI deleta en la mayoría de los casos a kanamicina -- pero en ciertas ocasiones también se pierde a ampicilina. La pérdida - de kanamicina podría ser por el ISI cercano o porque esté cercano al -- Tn3 que también es capaz de producir deleciones en ambas direcciones -- (14). Aún no podemos explicar el fenómeno que observamos porque el me- canismo de deleción a nivel de ISI y Tn3 no está bien entendido. Lo -- que queda claro es que estas deleciones no parecen producirse al azar, y que en las mutantes polAI y dam-3 el fenómeno a nivel de ISI se ve -- incrementado.

Conociendo lo que sucede espontáneamente en estas bacterias quisimos ver que sucedía al cultivar a las bacterias en presencia de -- bromuro de etidio, ya que se sabe que ciertos compuestos influyen en la estabilidad de un plásmido.

Para explicar la inestabilidad del plásmido por medio de -- agentes químicos se han propuesto cuatro hipótesis de las cuales dos -- son las más apoyadas. La primera propone que el sistema de replicación del plásmido es más sensible al compuesto que el sistema del cromosoma, ya que postula que existe interferencia del sistema de replicación por el compuesto (18). La segunda hipótesis explica que debe existir ven--

taja de las  $R^-$  para replicarse (en el medio con el compuesto químico) - con respecto a las  $R^+$  (19). Quisimos ver si con nuestros datos y tratando a las células  $R^+$  con bromuro de etidio podríamos apoyar alguna de estas hipótesis. El estudio previo de la sensibilidad a bromuro de etidio nos permitió elegir dosis adecuadas del compuesto para la realización del experimento de curación.

En la tabla se encuentran los resultados obtenidos. Se observa que RI-19 en presencia de bromuro de etidio no se inestabiliza, - ya que no encontramos células multisensibles o segregantes. Tal vez -- nuestros resultados se deban a que la sensibilidad del replicón del plásmido y del cromosoma son similares y por esto no encontramos células multisensibles. Para asegurar que RI-19 no tiene genes que codifiquen para una polimerasa o una metilasa, probamos las cepas polAI con metilmetanosulfonato y con las dam-3 se realizó una digestión con Mbo I; se encontró que RI-19 no tiene un gene similar a polAI ya que las cepas siguen siendo sensibles al compuesto, ni a dam-3 ya que las cepas fueron digeridas por la enzima (Fig. 1).

Con nuestros datos aún no podemos apoyar ninguna de las hipótesis propuestas, ya que no tenemos factores que nos ayuden a seleccionar  $R^+$  de  $R^-$  y tampoco parece ser que RI-19 tenga un replicón muy -- sensible a bromuro de etidio.

Continuando con el estudio de este plásmido se podrá entender el fenómeno de curación, la influencia de recA en la producción de deleciones a nivel de ISI así como la influencia de bromuro de etidio - en este fenómeno.

TABLA I

CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y BACTERIOFAGOS

Cepa	Genotipo o fenotipo	Fuente
GM110	F <sup>-</sup> <u>thr-1 leu-6 pro-A2 his-4 metB</u> <u>lacY1 galK2 ara-14 tsx-33 thi-1</u> <u>thyA12 dam-6 supE44</u>	M. G. Marinus
GM111	F <sup>-</sup> Cepa isogénica de GM110 pero <u>dam-3</u>	M. G. Marinus
W3110	F <sup>-</sup> Prototrofa	M. C. Gómez
GM33	F <sup>-</sup> Cepa isogénica de W3110 pero <u>dam-3</u>	M. G. Marinus
W3111	F <sup>-</sup> Cepa isogénica de W3110 pero <u>polA1</u>	A. A. Covarrubias
KTO1	F <sup>-</sup> Cepa isogénica de W3110 pero <u>recA56</u>	Este laboratorio
JM1452	F <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup> Thy <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup> Str <sup>r</sup>	G. Alfaro
JC5088	Hfr(KL16) <u>thr-300 ilv-318 spc-300 recA57</u> <u>thi-1 rel-1</u>	F. Bastarrachea
Plásmido <sup>b</sup>		
Rldrd-19	bla <sup>+</sup> (Ap <sup>r</sup> ), cat <sup>+</sup> (Cm <sup>r</sup> ), aphA <sup>+</sup> (Km <sup>r</sup> ), aadA <sup>+</sup> (Sm) sul <sup>r</sup> tra.	G. Alfaro
Fkm	aphA (Km <sup>r</sup> ) (32)	A. A. Covarrubias
pMB8::Tn3	Plásmido híbrido derivado de ColE1 bla <sup>+</sup> (Ap <sup>r</sup> ) (33)	M. López
RP4	bla <sup>+</sup> (Ap <sup>r</sup> ), aphA <sup>+</sup> (Km <sup>r</sup> ) Tc <sup>r</sup>	E. Lederberg
Bacteriófago R17	Fago de RNA de una cadena, especí- fico para pili tipo F (29)	M. C. Gómez

a) La nomenclatura utilizada es la recomendada por Demerec (34)

b) La nomenclatura para los plásmidos es la recomendada por Novick (1)

TABLA II

TIEMPO DE GENERACION

Cepa	Tiempo*
JM1452	27
JM1452/RI-19	30
GM110	31
GM110/RI-19	30
GM111	34
GM111/RI-19	40
W3110	26
W3110/RI-19	30
W3111	40
W3111/RI-19	41

\* Promedio de tres experimentos  
 resultados expresados en minutos.



TABLA III  
MUTABILIDAD ESPONTANEA\*

Cepa	Nal.	Rif
JM1452	$2.6 \times 10^{-9}$	$8 \times 10^{-9}$
JM1452/RI-19	$4 \times 10^{-9}$	$3.1 \times 10^{-9}$
GM110	$3 \times 10^{-8}$	$6.6 \times 10^{-9}$
GM110/RI-19	$5.3 \times 10^{-9}$	$9.3 \times 10^{-9}$
GM111	$5 \times 10^{-7}$	$3.7 \times 10^{-7}$
GM111/KI-19	$5.3 \times 10^{-7}$	$8.4 \times 10^{-7}$
W3110	$1.8 \times 10^{-9}$	$3.4 \times 10^{-8}$
W3110/RI-19	$3 \times 10^{-8}$	$7.4 \times 10^{-9}$
W3111	$5 \times 10^{-9}$	$7.1 \times 10^{-8}$
W3111/RI-19	$4.1 \times 10^{-9}$	$3.8 \times 10^{-8}$

\* Mutabilidad espontánea =  $\frac{\text{número de mutantes/ml}}{\text{número total de células/ml}}$

TABLA IV

FRECUENCIA DE TRANSPOSICION\*

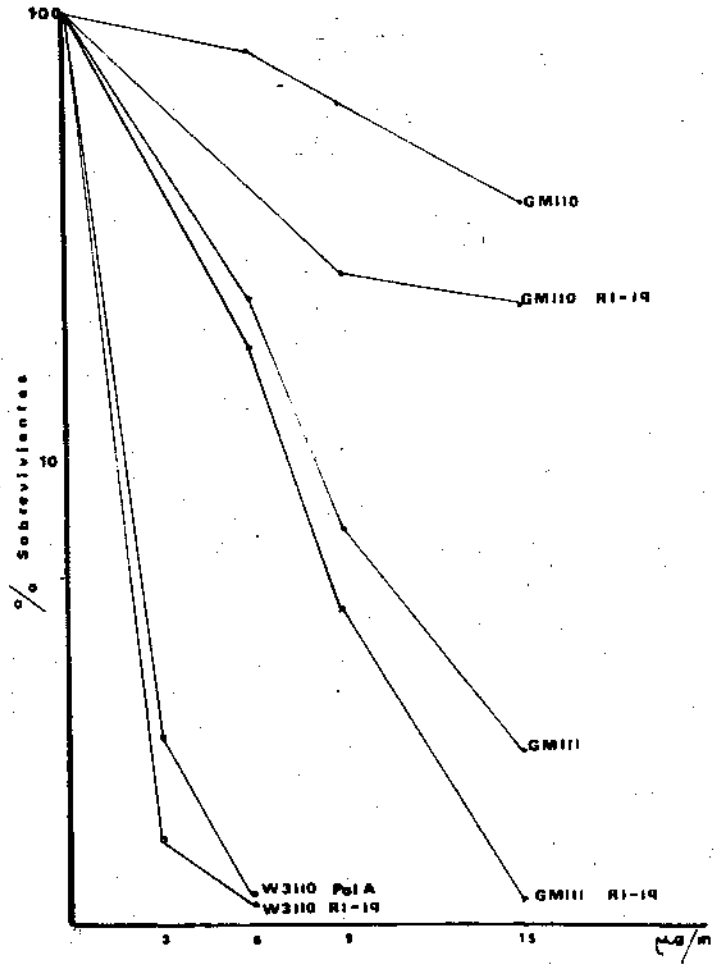
---

$$T_p \text{ (W3IIO)} = 1.9 \times 10^{-4}$$

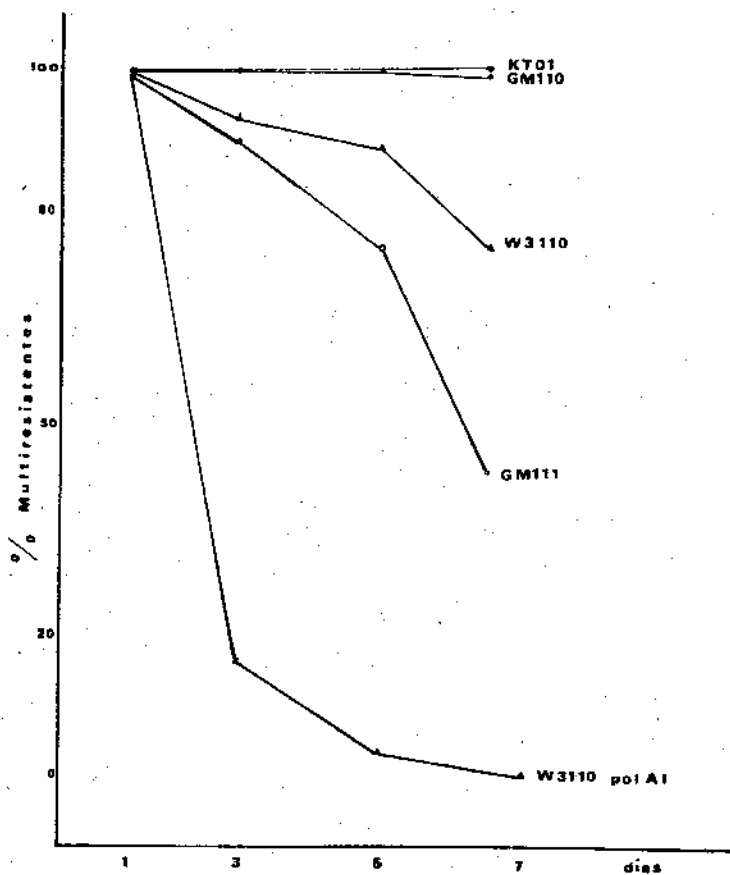
$$T_p \text{ (GMIII)} = 9.2 \times 10^{-4}$$

---

\* Transposición =  $\frac{\text{Células a las que se transpuso}}{\text{Células con el plásmido receptor}} \times \frac{1}{\text{peso molecular de receptor}}$



GRAFICA I: Curva de sensibilidad a bromuro de etidio.



GRAFICA II: Porcentaje de células multiresistentes obtenidas sin presión selectiva.

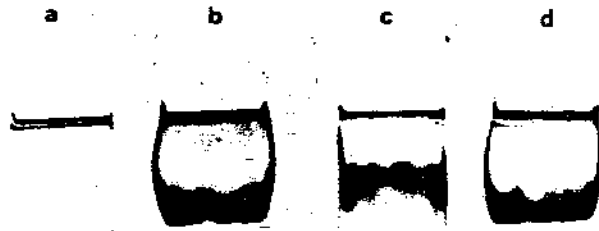


FIGURA 1: Digestión con la enzima MboI:  
a) GM111/R1-19 con enzima  
b) GM111/R1-19 sin enzima  
c) GM110/R1-19 con enzima  
d) GM110/R1-19 sin enzima



FIGURA 2: Electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. a) sin plásmido, b) R1-19, c) RP4, d) y e) CCP.

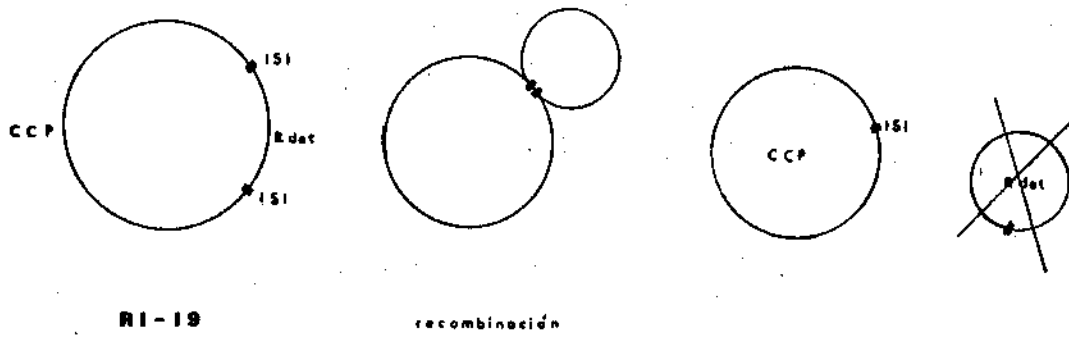


FIGURA 3: Modelo de generación del CCP a partir de recombinación a nivel de las ISI.

M A P A D E R 1 - 1 9

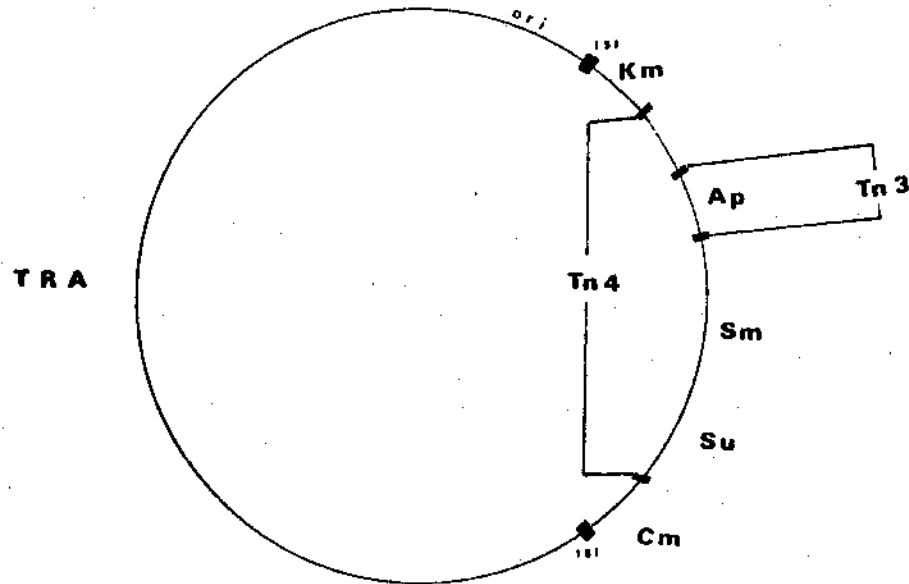


FIGURA 4:

Mapa de R1-19



BIBLIOGRAFIA

1. Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtis III, R., Datta, N. y Falkow, S. "Uniform Nomenclature for Bacterial Plasmids: a Proposal". *Bacteriol. Rev.* 40: 168-189 (1976).
2. Broda, P., Meacock, P., Achtman, M. "Early transfer of genes determining the transfer function by Hfr strains in *E. coli* K-12". *Mol. Gen. Genet.* 116: 336-347 (1972).
3. Watanabe, T. "Infectious drug resistance in enteric bacteria". *New Engl. J. Med.* 275: 88-895 (1968).
4. Miysubishi, S., Yamagishi, S., Sawai, T. y Kawabe H. *Drug Resistance Plasmid* (1977).
5. Cox, E.C., White, J.R. y Flaks, J.G. "Streptomycin action and the ribosome". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51: 703-709 (1964).
6. Falkow, S. "Infectious Multiple Drug Resistance". Pion Limited. London 1977.
7. Vapnek, D. "Identification of Individual Sex-factor DNA Strands and their Replication during Conjugation in Thermosensitive DNA Mutants of *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* 60: 413-424 (1971).
8. Willets, N. "The Genetics of Transmissible Plasmids". *Ann. Rev. of Genetics* 6: 257-269 (1972).
9. Helmuth, R. y Achtman, M. "Operon structure of DNA transfer cistrons on the F sex factor". *Nature* 257: 652-656 (1975).
10. Hahn, E.F. "Experimental Elimination of R Factors". *Antibiotics Chemoter.* 20: 196-226 (1976).
11. Watanabe, T., y Ogata, Y. "Genetic Stability of Various Resistance Factors in *E. coli* and *S. typhimurium*". *J. Bacteriol.* 102: 363-368 (1970).

12. Cohen, N.S. y Miller, A.C. "Non-chromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria II. Molecular Nature of R<sup>-</sup> factors isolated from Proteus mirabilis and Escherichia coli". J. Mol. Biol. 50: 671-687 (1970).
13. Kretschmer, J. y Cohen, N. "Selected Translocation of Plasmid Genes: Frequency and Regional Specificity of Translocation of the Tn3 Element". J. Bacteriol. 130: 888-899 (1976).
14. Ohtsubo, H., Ohmori, H., y Ohtsubo, E. "Nucleotide sequence Analysis of Tn3 (Ap) Implications for Insertion and Deletion". Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol. 43: 1269-1277 (1978).
15. Rubens, C., Heffron, F. y Falkow, S. "Transposition of a Plasmid Deoxyribonucleic Acid Sequence that Mediates Ampicilline Resistance: Independence from Host. rec. functions and orientation of Insertion". J. Bacteriol. 128: 425-434 (1976).
16. Ohtsubo, H., y Ohtsubo, E. "Repeated DNA Sequence in Plasmids, Phages and Bacterial Chromosomes". In DNA Insertions elements, plasmids and episomes (ed. A.I. Bukhari et al), pp 49-63. Cold Spring Harbor, New York.
17. Jacob, F., Brenner, S. y Cuzin, F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 329-348 (1963).
18. Hohn, B. y Korn, D. "Cosegregation of a Sex Factor with E. coli Chromosome during Curing by Acridine Orange". J. Mol. Biol. 45: 385-395 (1969).
19. Yoshikawa, M. "Selective Enrichment of R<sup>-</sup> Segregants as the Main Mechanism of "Curing" of the R Factor by Acridine Dyes". Genet. Res. Camb. 17: 9-16 (1971).

20. Blohm, D. y Goebel, W. "Restriction Map of Antibiotic Resistance Plasmid Rldrd-19 and its Derivatives pKN102 and Rldrd-16 for the Enzymes BamHI, Hind. III, Eco. RI and SalI". Molec. Gen. Genetics 167: 119-127 (1978).
21. Mitsuhashi, S., Harada, K. "Elimination of transmissible drugs resistance by treatment with acriflavin". Nature 189: 947-953 (1968).
22. Freifeld, D. "Studies on E. coli sex factor. II Some physical properties of Flac and F DNA". J. Mol. Biol. 32: 25-35 (1968).
23. Marinus, M.G. y Morris, N.R. "Isolation of Deoxiribonucleic Acid Methylase Mutants of Escherichia coli". J. Bacteriol. 104: 57-62 (1970).
24. De Lucia P., y Cairns, J. "Isolation of an E. coli Strains with a Mutation Affecting DNA Polymerase". Nature 224: 1164-1166 (1969).
25. Chander, M., Silver, F. y Caro, L. "Suppression of an Escherichia coli dnaA Mutation by the Integrated R factor R110.1: Generation of Small Plasmids After Integration". J. Bacteriol. 130: 303-311 (1977).
26. Lederberg, J. y Lederberg E.M. "Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants". J. Bacteriol. 63: 399-406 (1951).
27. Miller, H.J. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. 1972.
28. Crawford, E.M. y Gesteland, R. "The adsorption of Bacteriophage R17". Virology 22: 165-167 (1964).
29. Betlachm, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M. y Boyer, H.W. "A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA" Fed. Proc. 35: 2037-2043 (1976).

30. Dagert, M. y Ehrlich, S. "Prolonged Incubation in Calcium Chloride Improves the Competence of Escherichia coli Cells". Gene 6: 23-28 (1979).
31. Bolivar, F., Rodríguez, M.C., Betlach, M. y Boyer, H. "Construction and characterization of new cloning vehicles. I Ampicillin resistance derivatives of the plasmid pMB9" Gene 2: 75-93 (1977).
32. Heffron, F., Rubens, C. y Falkow, S. "Translocation of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance: Molecular nature and specificity". Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 3623-3627 (1975).
33. Herschfield, V., Boyer, H., Yanofsky, C., Lovett, M.A. y Helinski, D. "Plasmid ColE1 as a Molecular Vehicle for Cloning and Amplification". Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 3455-3459 (1974).
34. Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J. y Hartman, P.E. "A proposal for uniform nomenclature in bacterial genetics". Genetics 54: 61-76 (1966).
35. Bertino, B.J. y Stacey, A. "A suggested mechanism for the selective procedure for isolating thymine - requiring mutants of Escherichia coli". Biochem. J. 101: 32c-33c (1967).
36. Clark, A.J. "Recombination deficient mutants of E. coli and other bacteria". Ann. Rev. Genet. 7: 67-86. (1973).
37. Jenkins, S.T., y Bennett, P.M. "Effect of mutations in Deoxyribonucleic Acid repair pathways on the sensitivity of Escherichia coli K-12 strains to Nitrofurantoin". J. Bacteriol. 125: 1214-1216 (1976).
38. Kretchmer, J.P. y Cohen, N.S. "Effect of temperature on translocation frequency of the Tn3 Element". J. Bacteriol. 139: 515-519 (1979).

39. Marinus, M.G. y Morris, R. "Biological function for 6-methyladenine residues in the DNA of Escherichia coli K-12" J. Mol. Biol. 85: 309-322 (1974).
40. Reif, H.J. y Saedler, H. "IS1 in Involved in Deletion Formation in the gal region of E. coli K-12" Molec. Gen. Genet. 137: 17-28 (1975).