

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

Influencia de la proteína HimA
en la recombinación intraplasmídica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ALEJANDRO GARIBAY BORDON

Ciudad Universitaria



1990



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.

I N D I C E

	pág.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. MATERIAL Y METODOS	24
A) MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	24
B) CEPAS BACTERIANAS, PLASMIDOS Y FAGOS	27
C) METODOS DE GENETICA BACTERIANA	29
1. CULTIVOS BACTERIANOS	29
2. CONSERVACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS ..	29
3. OBTENCION DE CUENTAS VIABLES	30
4. CONJUGACION BACTERIANA	30
5. TRANSFORMACION BACTERIANA	32
6. PRUEBA DE LA ESTABILIDAD DEL PLASMIDO R1-19	33
7. DETERMINACION DEL PATRON DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS	34
8. PRUEBA DE SENSIBILIDAD AL FAGO R17	35
9. TITULACION DEL FAGO LAMBDA	36
10. VERIFICACION DEL FENOTIPO Hima ⁺ Y Hima ⁻	36

11. OBTENCION DE MUTANTES ESPONTANEAS RESISTENTES A ANTIBIOTICOS	37
12. CALCULO DE LA FRECUENCIA DE LAS BACTERIAS RESISTENTES A UN ANTIBIOTICO EN UN CULTIVO	37
D) METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	38
1. VISUALIZACION DE LOS PLASMIDOS	38
2. HIBRIDIZACION DNA-DNA EN FILTRO DE NITROCELULOSA (HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN)	41
IV. RESULTADOS	44
A) DISOCIACION DEL PLASMIDO FII R1-19 EN <u>E.coli</u> HimA ⁺ Y HimA ⁻	44
B) EFICIENCIA DE RECOMBINACION HOMOLOGA EN <u>E. coli</u> HimA ⁻	52
1. FRECUENCIA DE MUTACION ESPONTANEA A Nal ^r	53
2. FRECUENCIA DE RECOMBINACION HOMOLOGA INTRA E INTERPLASMIDICA	55
3. FRECUENCIA DE RECOMBINACION CROMOSOMICA POSTCONJUGACIONAL	59
C) GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA EN LAS CEPAS HimA ⁺ Y HimA ⁻ Y SU INFLUENCIA EN LA RECOMBINACION INTRAPLASMIDICA DEL PLASMIDO R1-19	62
1. GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL PLASMIDO pMS01 EN CELULAS EN DIFERENTES PUNTOS DE LA CURVA DE CRECIMIENTO (EN GELES CON 25µg DE CLOROQUINA/ml)	64
2. GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL PLASMIDO pMS01 EN CELULAS CULTIVADAS EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE NOVOBIOCINA (EN GELES CON 25µg DE CLOROQUINA/ml)	76

3.	DISOCIACION DEL PLASMIDO FII R1-19 EN <u>E. coli</u> y en <u>S. typhimurium</u> CULTIVADAS EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE NOVOBIOCINA ...	80
4.	GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL PLASMIDO pMS01 EN CELULAS EN DIFERENTES PUNTOS DE LA CURVA DE CRECIMIENTO (EN GELES CON 9µg DE CLOROQUINA/ml)	83
5.	GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL PLASMIDO pMS01 EN CELULAS CULTIVADAS EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE NOVOBIOCINA (EN GELES CON 9µg DE CLOROQUINA/ml)	88
6.	PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL R1-19 EN <u>Salmonella typhimurium</u> CULTIVADA EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE NOVOBIOCINA	91
V. DISCUSION		93
VI. CONCLUSIONES		103
VII. REFERENCIAS		106

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	pág.
FIGURA 1	5
FIGURA 2	7
FIGURA 3	8
FIGURA 4	9
FIGURA 5	10
FIGURA 6	12
FIGURA 7	45
FIGURA 8	48
FIGURA 9	49
FIGURA 10	55
FIGURA 11	67
FIGURA 12	68
FIGURA 13	70
FIGURA 14	71
FIGURA 15	73
FIGURA 16	74
FIGURA 17	77
FIGURA 18	78
FIGURA 19	79
FIGURA 20	85
FIGURA 21	86
FIGURA 22	87
FIGURA 23	90
TABLA I	28
TABLA II	47
TABLA III	54
TABLA IV	58
TABLA V	61
TABLA VI	81
TABLA VII	82
TABLA VIII	92

1. RESUMEN

Los plásmidos FII de multirresistencia a antibióticos en bacterias están formados por un r-det que contiene la mayoría de los genes para la resistencia a antibióticos, y un RTF, que contiene las secuencias necesarias para su replicación autónoma y transferencia por conjugación. Estos elementos están unidos por dos secuencia de inserción IS₁. Si se lleva a cabo un evento de recombinación intraplasmídica de las IS₁, el plásmido puede disociarse. En una población de bacterias en la que esto ocurre, se pierde la región r-det, ya que no puede replicarse de manera autónoma. En Escherichia coli este evento ocurre a una frecuencia muy baja, mientras que en Salmonella typhimurium este evento es muy frecuente. Actualmente se desconoce la razón de este fenómeno. En este trabajo se probó la hipótesis de que en E. coli la unión del factor de integración al huésped (IHF) a los extremos de las IS₁, bloquea la recombinación de estas secuencias en los plásmidos FII, y que esto no ocurre en S. typhimurium. Debido a que el IHF modifica la topología del DNA, y su ausencia disminuye la concentración intracelular de la enzima girasa, se estudió el papel del superenrollamiento (SE) del DNA en la recombinación de las IS₁ de estos plásmidos.

Para ello se cuantificó la frecuencia de disociación del plásmido FII R1-19 por recombinación de las IS₁, en células de E. coli IHF⁺ e IHF⁻. Esta frecuencia se cuantificó también en células de E. coli IHF⁺ y S. typhimurium tratadas con novobiocina, un inhibidor de la girasa. El grado de SE del DNA de cada cepa en cada uno de estos experimentos se determinó indirectamente por medio del análisis de los topoisómeros de un plásmido reportero en geles de agarosa con cloroquina.

Los resultados mostraron que la frecuencia de recombinación de las IS₁ del plásmido FII R1-19 es mayor en la cepa IHF⁻ que en la cepa silvestre. Sin embargo en esta mutante, la recombinación homóloga de secuencias distintas a IS₁ mostró un comportamiento normal.

Por otra parte se encontró que en E. coli el relajamiento del DNA inducido por novobiocina, no modifica la frecuencia de recombinación de las IS₁. Sin embargo, en S. typhimurium la misma concentración de novobiocina si incrementó la frecuencia de recombinación de las IS₁, aunque no afectó de manera importante el SE del DNA.

Los resultados obtenidos sugieren que en E. coli la unión del IHF a los extremos de las IS₁ interfiere en la recombinación de estas secuencias en el plásmido R1-19. Por otra parte, el grado de SE del DNA parece ser un factor importante en para la recombinación de las IS₁ en S. typhimurium, y no en E. coli.

11. INTRODUCCION

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosomal ó de RNA, generalmente circulares y superhelicoidales, que son capaces de replicarse de manera autónoma. Estas moléculas se han encontrado tanto en organismos procariontes como eucariontes (Gómez, 1983 y 1988).

En el caso de las bacterias, la información presente en estas moléculas no es esencial para su viabilidad. Incluso pueden provocar el aumento del tiempo de generación bacteriana. Sin embargo, la información contenida en los plásmidos puede conferir a las bacterias, algunas propiedades que pueden serles útiles para sobrevivir en ciertas condiciones, como son la resistencia a antibióticos, agentes quimioterapéuticos, iones de metales pesados y suero; producción de enterotoxinas, hemolisinas y bacteriocinas; factores de colonización; degradación de carbohidratos e hidrocarburos; enzimas de restricción; fijación de nitrógeno e inducción de tumores en plantas. Los plásmidos pueden también conferir a las bacterias la capacidad de transferir por conjugación a otra bacteria el propio plásmido ó incluso parte de su cromosoma (Gómez, 1983 y 1988).

Un porcentaje importante de las Enterobacterias contiene plásmidos. Los plásmidos se han clasificado de diversas maneras, por ejemplo, de acuerdo a las características que confieren a su huésped, o a su propiedad de incompatibilidad (Gómez, 1983 y 1988).

Los plásmidos tipo R son aquellos que confieren resistencia a antibióticos a las bacterias que los poseen. Estos genes pueden estar agrupados ó separados dentro de la molécula. Muchos de estos plásmidos son capaces de transferirse por conjugación de bacteria a bacteria (Gómez, 1983 y 1988).

Los plásmidos pueden también clasificarse en grupos de incompatibilidad. Dos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad cuando no pueden coexistir en la misma bacteria. Este fenómeno se debe a la competencia de ambas moléculas por la maquinaria bacteriana que utilizan para replicarse ó para su segregación en la células hijas (Gómez, 1988).

Los plásmidos del grupo de incompatibilidad FII son de los más estudiados. Fueron aislados de Enterobacterias patógenas que presentaron resistencia a más de cuatro antibióticos. Los más conocidos son el R1-19 aislado en Inglaterra de una cepa de Salmonella typhimurium, el R100 aislado en Japón de una cepa de Shigella y el R6-5 aislado en Alemania de una cepa de Escherichia coli (Cruz y Gómez, 1984). Además de su importancia clínica, estos plásmidos han sido utilizados por diferentes grupos de investigación como modelo para estudiar la replicación,

recombinación, estabilidad e incompatibilidad de plásmidos grandes (Gómez, 1983). Los plásmidos FII tienen un peso molecular de aproximadamente $40-80 \times 10^4$ daltones (60 a 120 Kilobases, Kb) y se caracterizan por poseer una estructura molecular similar, compuesta por dos regiones separadas por secuencias de inserción IS_1 colocadas en sentido directo: El r-det (determinante de resistencia) y el RTF (factor de transferencia) (Fig. 1) (Chandler y Galas, 1985).

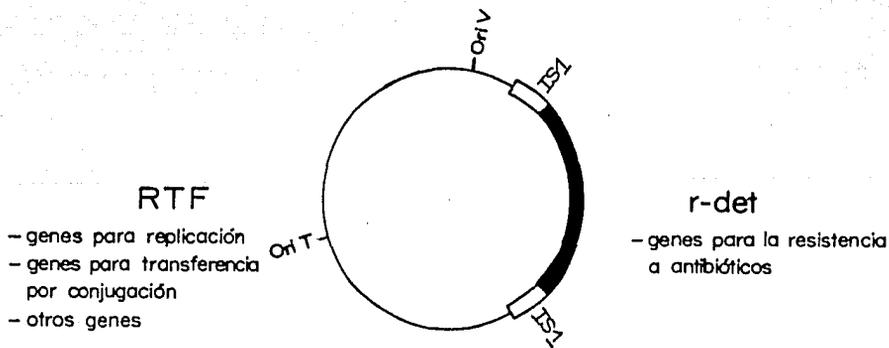


Figura 1. Esquema de un plásmido tipo FII.

En el r-det están agrupados la mayoría de los genes de resistencia a antibióticos. Esta región puede estar formada por varios transposones simples y por transposones compuestos, que son genes que se encuentran entre dos secuencias de inserción IS, y por ello pueden moverse como transposones. La disposición de estos elementos es muy especial, pudiéndose hallar un transposón dentro de otro, como en el caso del r-det del R1-19, en el cual el Tn₃ (Apr) se encuentra dentro del Tn₄ (Ap^r, Sp^r-Sm^r) y puede transponer independientemente y a una frecuencia distinta del último.

En el RTF se encuentra la información genética para la replicación autónoma (secuencia del origen de replicación oriV y genes rep), para su transferencia por conjugación (secuencia del origen de transferencia oriT y operón tra), además de sus propiedades de incompatibilidad y resistencia al suero (Gómez, 1983 y 1988).

Las secuencias de inserción IS₁ tienen un tamaño de 768 pb y forman parte de un grupo de elementos genéticos móviles ó transposones pequeños (<2000 pb), que poseen la propiedad de movilizarse por transposición y de generar rearrreglos en el material genético bacteriano (Berg et al., 1988).

Una molécula de DNA con dos secuencias homólogas, como los plásmidos FII, puede experimentar eventos de recombinación intraplasmídica a nivel de ellas. Cuando ocurre un evento de recombinación en una molécula con secuencias homólogas colocadas

en una orientación inversa, el segmento que se encuentra entre ellas experimenta una inversión de sentido (Fig. 2a). Si el evento de recombinación ocurre entre secuencias con orientación directa, el resultado será la disociación de la molécula (Fig. 2b). De esta manera se forman dos moléculas de DNA con una secuencia homóloga cada una. La recombinación de estas secuencias es un fenómeno dependiente de la proteína RecA, y de enzimas adicionales entre las que se encuentran exo y endonucleasas, helicasas y ligasas (Cruz y Gómez, 1984).

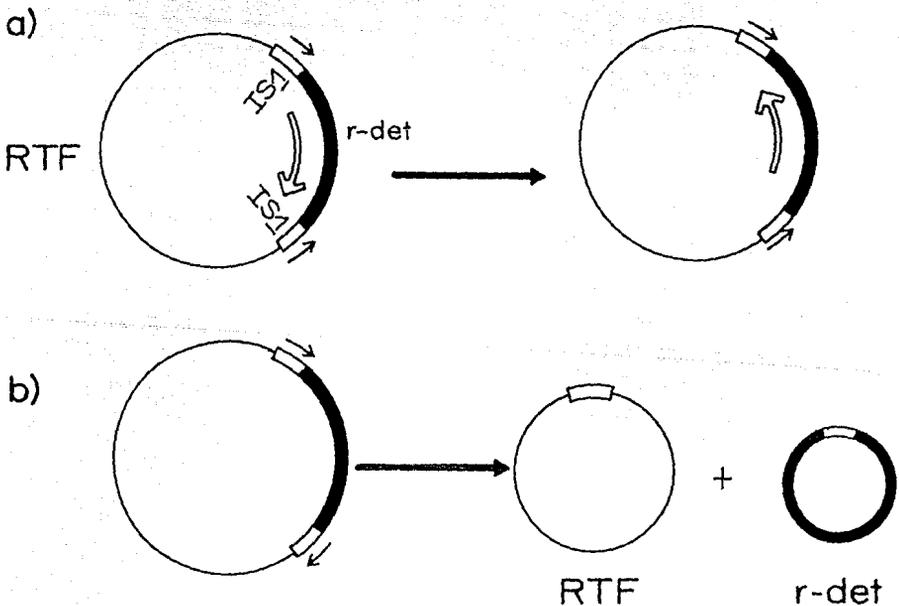


Figura 2. Eventos de recombinación entre dos secuencias homólogas. a) entre dos secuencias homólogas inversas; b) entre dos secuencias homólogas directas.

La recombinación entre las dos IS_I directas que flanquean al r-det de los plásmidos FII induce la disociación del r-det y el RTF, originándose así dos moléculas, con una IS_I cada una (Fig. 3) (Chandler, 1977).

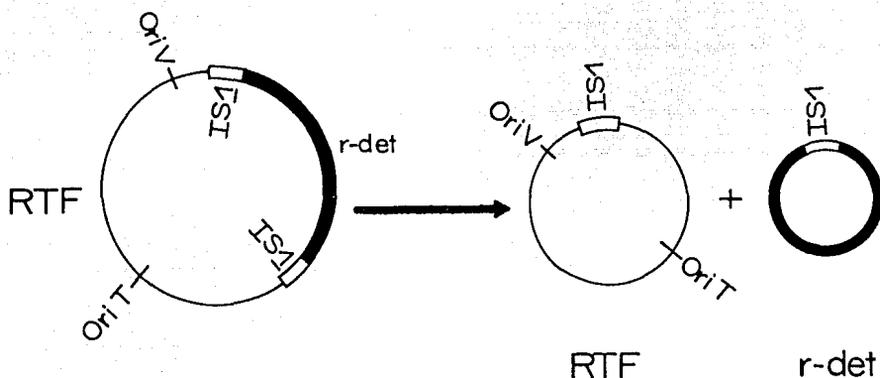


Figura 3. Disociación de un plásmido tipo FII mediada por la recombinación de sus IS_I.

Cuando ocurre la disociación de un plásmido FII, se generan en la población bacteriana, células cuyo plásmido sólo conserva la región RTF, pues ésta tiene las secuencias necesarias para su replicación y segregación en la población. El r-det se pierde conforme pasan las generaciones bacterianas, debido a que esta región no puede replicarse de manera autónoma, sino solamente cuando está unida al RTF ó a otro replicón. De esta manera se generan bacterias que pierden la resistencia a los antibióticos conferida por el r-det del plásmido (Fig. 4a).

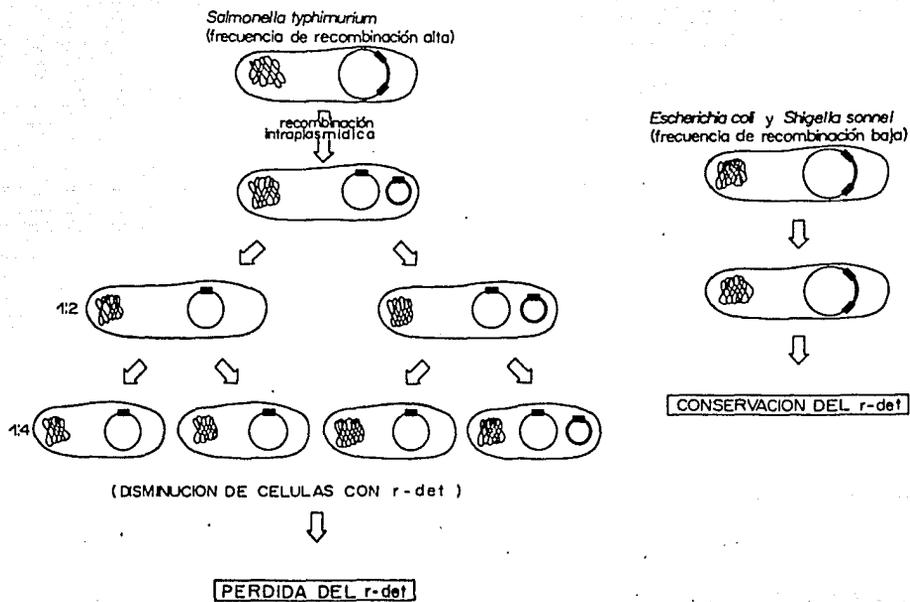


Figura 4. Estabilidad de los plásmidos tipo FII en distintas cepas bacterianas.

La frecuencia de recombinación de las IS₁ es mayor en las bacterias Salmonella typhimurium, y Proteus mirabilis que en Escherichia coli y Shigella sonnei (Gómez, 1983). En S. typhimurium la alta frecuencia de recombinación provoca la disociación del plásmido y la pérdida de los genes de resistencia a antibióticos (Fig. 4a). En P. mirabilis la recombinación de las IS₁ hace que la región del r-det se amplifique dentro del plásmido (Fig. 5).

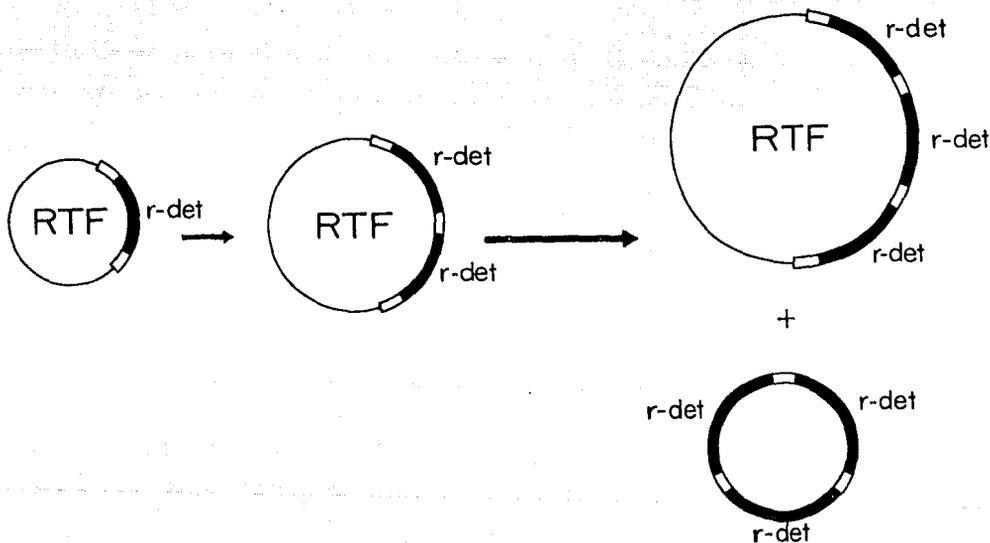


Figura 5. Comportamiento de un plásmido tipo FII en Proteus mirabilis.

En E. coli y S. sonnei la recombinación intraplásmidica se lleva a cabo a una frecuencia muy baja, por lo que son muy pocas las células que pierden la resistencia a los antibióticos en una población bacteriana (Fig. 4b) (Gómez, 1983).

Actualmente no se conocen los mecanismos moleculares que determinan las diferencias en la frecuencia de recombinación de las IS₁ en diferentes Enterobacterias.

En algunas cepas de E. coli con comportamiento de hiper-recombinación (Hiper-rec) como las dam-3 (Marinus y Konrad, 1976) y las polA1 (Konrad, 1977), las IS₁ recombinan con una frecuencia un poco mayor que en las cepas silvestres. Sin embargo, la frecuencia de recombinación de las IS₁ en estas cepas mutantes es significativamente más baja que la de S. typhimurium (Gómez y Torres, 1983). Las mutantes mencionadas tienen un DNA con un número alto de cortes de una de las cadenas, lo cual puede generar zonas de DNA de cadena sencilla. Esto puede hacer de las IS₁ un mejor sustrato para las enzimas de recombinación como RecA (Cruz y Gomez, 1984; Lewin, 1987). Esto sugiere que en las mutantes Hiper-rec la disociación se debe a un incremento en la frecuencia de recombinación homóloga a nivel de las IS₁. En cambio, es posible que en las cepas silvestres de S. typhimurium exista alguna vía distinta y más eficiente para la disociación del plásmido. Es decir, que en S. typhimurium pueden existir sistemas de recombinación que hagan que las IS₁ recombinen de una forma más eficiente que en E. coli. Se ha demostrado que la recombinación general (de secuencias homólogas distintas de IS₁) es similar en ambas cepas (Gómez y Torres, 1983), por lo cual pensamos que el sistema mencionado para S. typhimurium tendría que ser específico para la recombinación de las IS₁.

Al parecer, el plásmido R1-19 codifica para un represor de la recombinación de secuencias homólogas (Chernin y Ovadis, 1980). Podría plantearse la hipótesis de que dicho represor es más eficiente en *E. coli* que en *S. typhimurium*, ó bien que en *S. typhimurium* existen otros sistemas de recombinación, aparte de los que actúan en la recombinación general de secuencias homólogas, y que estos sistemas son independientes del represor de R1-19. Uno de éstos podría ser el codificado por el gen dor. Esta podría ser la razón por la que las IS₁ recombinaran mejor en *S. typhimurium*, ya que al parecer dor está involucrado unicamente en la recombinación de ciertas secuencias, tales como las IS₁ y algunas secuencias homólogas de los plásmidos FII (Watanabe et al., 1982). En *E. coli* no se ha descrito un gen similar a dor.

En resumen, hemos visto que la recombinación homóloga dependiente de RecA de las dos IS₁ de los plásmidos FII, es la causa de su disociación. Sin embargo, las IS₁ son transposones y esto debe tomarse en cuenta al analizar la estructura y el comportamiento de los plásmidos FII, ya que el evento de disociación de estos plásmidos podría estar determinado por uno de los pasos de la transposición de la IS₁ (Fig. 6).

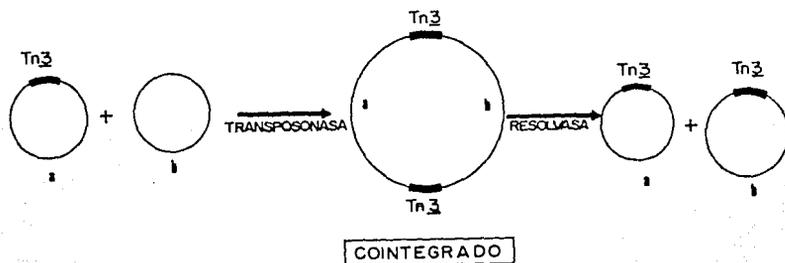


Figura 6. Formación de un cointegrado del Transposón Tn₃ y su resolución.

Entre las propiedades de los transposones destacan las de insertarse (transposición conservativa) y la de insertar una copia (transposición replicativa) en una molécula de DNA propia o vecina. Este tipo de eventos son independientes de RecA, y para que se lleven a cabo se requieren sitios blancos preferenciales cuyas secuencias son distintas para cada transposón (Berg et al., 1988). Las IS₁ pueden transponer tanto de manera replicativa, como conservativa (Chandler y Galas, 1985).

Los plásmidos FII poseen dentro de su secuencia dos IS₁ directas que son transposones. Esta estructura es similar a los intermediarios de la transposición replicativa de los transposones de la familia Tn₃, llamados cointegrados (Fig 6). Para la formación de un cointegrado se requiere de la enzima transposonasa y de una similitud de secuencia mínima entre ambas moléculas. Este cointegrado tiene dos copias del transposón y puede resolverse en dos moléculas cada una con un transposón (Fig. 6), para lo cual utiliza una enzima denominada resolvasa, codificada por el mismo Tn₃ (Gomez, 1982; Berg et al., 1988). Como ya dijimos, esta vía de disociación de un cointegrado con dos transposones es independiente de RecA. Los productos de la resolución de un cointegrado pueden compararse a las dos moléculas que se obtienen al disociarse un plásmido FII, por lo que si estos plásmidos fueran cointegrados de la transposición de las IS₁, la resolvasa podría disociarlos. Sin embargo, se sabe que los cointegrados formados con las secuencias IS₁ son moléculas muy estables, a diferencia de los de Tn₃, que son rápidamente resueltos por la resolvasa de este sistema

(Chandler y Galas, 1985). Este hecho nos hace pensar que los plásmidos FII probablemente no son intermediarios de la transposición de las IS₁. Sin embargo, es importante destacar que se trata de dos transposones distintos y que su comportamiento no tiene que ser necesariamente el mismo.

Se ha sugerido que la proteína InSA es la transposonasa de las IS₁ y que estos transposones no codifican para una resolvasa, ó bien que ésta es muy poco activa. En el caso de existir una resolvasa, ésta tendría que ser funcional solamente en *S. typhimurium*, ya que ni en *E. coli* ni en *S. sonnei* se observa disociación de los plásmidos. Otra posibilidad es que la resolvasa esté codificada por el cromosoma de *S. typhimurium*. Sin embargo, esta última posibilidad parece difícil de apoyar, pues en el caso de la familia de transposones TnA (Tn₃ y similares), la resolvasa está codificada por el mismo transposón.

Para descartar ambas posibilidades podemos valernos de algunos reportes y de resultados de nuestro laboratorio, en los cuales se sugiere que en *S. typhimurium* no se detecta actividad de resolvasa y que las IS₁ no codifican para una enzima con esta actividad.

La hipótesis de que las IS₁ no codifican para alguna resolvasa se apoya en un experimento en el que se introdujo un plásmido pequeño multicopia con una IS₁ (pBR322::IS₁), dentro de una cepa de *S. typhimurium* RecA⁻, y en esta cepa no se disoció un plásmido FII (Martín I. García Castro, comunicación personal).

Si las IS₁ codificaran para una resolvasa, ésta estaría en una concentración elevada y los plásmidos deberían disociarse. Estos datos sugieren varias posibilidades: 1) que la IS₁ no codifica para una resolvasa; 2) que la transcripción del gen es mínima; 3) que la resolvasa es poco activa; ó 4) que la resolvasa solamente puede actuar en cis.

En S. typhimurium no se ha detectado una actividad de resolvasa para las IS₁, ya que se ha visto que en cepas RecA⁻ no hay disociación de los plásmidos FII (Watanabe, 1982; Gómez y Torres, 1983).

En resumen, pensamos que la disociación de un plásmido posiblemente no se debe a la acción de resolvasas sobre las secuencias IS₁, sino a la acción de un sistema de recombinación dependiente de RecA que actúa sobre las IS₁.

Planteamos dos explicaciones al respecto. La primera es, que este sistema solamente actúe eficientemente en S. typhimurium y que además sea distinto al sistema de recombinación general, el cual actúa igual en E. coli y en S. typhimurium. Como ya se mencionó, en S. typhimurium el gen dor se requiere para la recombinación de ciertas secuencias específicas, entre las cuales encontramos también a las IS₁. Es posible que en E. coli no exista este sistema, ó que se encuentre bloqueado en esta bacteria y no lo esté en S. typhimurium, y que a ello se deba la diferencia en la recombinación de las IS₁ entre ambas bacterias.

La otra posibilidad es que las IS₁ se recombinen a través del sistema de recombinación de secuencias homólogas, dependiente de RecA, y que este sistema funcione de manera distinta en *E. coli* y en *S. typhimurium*. Podría pensarse que en bacterias como *E. coli* se seleccionó algún mecanismo sencillo para inhibir la acción de este sistema sobre las IS₁ del plásmido.

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados, puede proponerse la hipótesis de que en *E. coli* las IS₁ recombinan a una frecuencia relativamente baja, debido a que se encuentran bloqueadas de alguna manera y el sistema de recombinación (ya sea el codificado por *dcr* ó el de recombinación de secuencias homólogas) no puede actuar sobre ellas.

Recientemente se reportó que en *E. coli* dos proteínas interaccionan con los extremos de la IS₁: La proteína InSA (Zerbib *et al.*, 1987), que está codificada por la propia IS₁, y el Factor de Integración al Huesped (IHF) (Gamas *et al.*, 1987). La unión de estas proteínas a las IS₁ en *E. coli* podría ser la causa del bloqueo a las enzimas de recombinación.

La proteína InSA es una proteína básica de 10.6 Kd, codificada por la IS₁. En la secuencia de la IS₁ hay 8 marcos de lectura posibles para polipéptidos pequeños (de mínimo 50 pb), y aunque a través del control del promotor P₁ de lambda sólo pudo detectarse la síntesis de InSA (Zerbib *et al.*, 1987), ha sido demostrado que InSB es un polipéptido necesario para la formación

de cointegrados en la transposición de IS₁, por lo que los otros marcos de lectura podrían codificar para proteínas accesorias (Jakowec et al., 1988).

InSA presenta una similitud estadísticamente significativa con una región de las proteínas ci y Cro del fago λ , así como con la proteína CAP, las cuales reconocen secuencias específicas del DNA. Existen estudios que demuestran que in vitro, la proteína InSA se une específicamente a secuencias de aproximadamente 23 pares de bases (pb) en ambos extremos de la IS₁ (Zerbib et al., 1987). Por esta razón pensamos que esta proteína puede unirse a la IS₁ in vivo. Así, la unión IS₁-InSA podría bloquear a las enzimas implicadas en la recombinación de las IS₁.

Esta explicación no parece ser la adecuada, debido a que recientemente se probaron cepas de S. typhimurium a las cuales se les introdujo un plásmido pequeño multicopia con IS₁ (pBR322::IS₁) y un plásmido FII R100-t; teóricamente estas cepas tienen la capacidad de sintetizar la proteína InSA, por lo que su concentración citoplasmática sería mayor que en las que no tienen IS₁ cromosomales. En ellas las IS₁ del R100-t se encontrarían bloqueadas y no podrían recombinar; sin embargo, al realizar un análisis se encontró que estas cepas disocian al plásmido a una frecuencia similar a las que no tienen IS₁. También se encontraron algunas cepas de E. coli que no tenían IS₁ en su cromosoma y, de acuerdo al razonamiento planteado, en esta cepa la proteína InSA estaría presente en una concentración muy baja,

ya que sólo tendrían las tres IS_i del plásmido; por ello las IS_i al no estar bloqueadas podrían recombinar libremente. Contrariamente a esto, el plásmido R100-t no mostró un aumento en su frecuencia de disociación en estas cepas (M.I. Garcia C., comunicación personal).

Otra posible forma de bloquear a las IS_i sería por la unión del IHF, el cual ha sido ampliamente estudiado, debido a que está implicado en una gran variedad de procesos e interacciones con otras proteínas básicas en E. coli y S. typhimurium (Pettijohn, 1988; Friedman, 1988).

Este factor es un heterodimero formado por dos proteínas llamadas subunidad α y β . La subunidad α ó proteína HimA es un polipéptido de 11,224 daltones de peso molecular. Esta subunidad es el producto del gen himA (99 pb), el cual se encuentra en el minuto 38 del cromosoma de E. coli. La subunidad β está codificada por el gen himD/hip (min 25) cuyo producto tiene un peso molecular de 10,581. Las subunidades α y β son homologas (Miller, 1984) y su producción se encuentra autorregulada (Pettijohn, 1988).

El IHF es una proteína básica que ha sido clasificada dentro del grupo de las proteínas tipo histona de los procariontes. Dentro de este grupo están también proteínas como la HU, H1, HLP y H. Este tipo de proteínas puede unirse al DNA en algunas secuencias determinadas y modificar ó mantener una topología determinada en la molécula (Pettijohn, 1988).

La secuencia del IHF es substancialmente similar a la de la proteína HU (Miller, 1984). El IHF se encuentra en una concentración estimada entre 14,000 y 20,000 dímeros mientras que HU se estima entre 60,000 y 120,000 copias por célula en crecimiento (Pettijohn, 1988).

El IHF posee gran afinidad por la secuencia de unión consenso Py-AANNNTTIGAT-A/T (Gamas et al., 1987). Para que se lleve a cabo la unión del factor al DNA, la secuencia debe estar localizada en un región rica en A-T. La unión del IHF al DNA induce un doblaje hacia el extremo 5' del sitio de unión (Higgins et al., 1989). Se ha demostrado la unión del IHF a dos sitios de los extremos de la secuencia de inserción IS₁ (Gamas et al., 1987).

El IHF además se une a otros transposones, a diferentes regiones del cromosoma bacteriano y a varios elementos genéticos libres como son los fagos y los plásmidos. Esta unión al parecer es importante en varios procesos de la dinámica del DNA de estos elementos y de los transposones, e inclusive puede afectar la expresión de algunos genes. En seguida citamos algunos ejemplos interesantes al respecto.

a) El IHF participa en procesos de transposición; por ejemplo, en mutantes IHF⁻, los rearreglos del DNA promovidos por la secuencia de inserción IS₁₀ disminuyen de 5 a 9 veces. Así mismo, si se afecta el sitio de unión de IS₁₀ al IHF se reduce la transposición de esta secuencia. Además el IHF participa en la

transposición de Tn10. Sin embargo, aún no se sabe si el IHF afecta la transposición de la secuencia IS1 (Friedman, 1988).

b) El IHF es necesario para la integración de los bacteriófagos $\phi 80$, P2 y lambda al cromosoma de E. coli. La integración se lleva a cabo mediante un evento de recombinación sitio específica entre una secuencia de 15 pb del fago, y una secuencia homóloga del cromosoma (Drlica y Rouviere-Yaniv, 1987; Friedman, 1988).

c) El IHF participa en la expresión de algunos genes, aunque aún no se sabe si su modo de acción es directo ó indirecto (Friedman, 1988). Sin embargo, se ha demostrado que en mutantes IHF⁻ la concentración de la enzima girasa se encuentra disminuida por lo menos cuatro veces (Gellert et al., 1983).

En el caso de los rearrreglos promovidos por la IS10 los reportes señalan al IHF como un factor que incrementa su frecuencia de recombinación. Es decir, se esperaría que en el caso de IS1, el IHF también incrementara su frecuencia de recombinación. Sin embargo, el IHF interacciona de manera directa uniéndose a la IS1, lo cual no está reportado en el caso de la IS10.

En cuanto a la integración de lambda, el IHF es necesario para que se lleve a cabo el evento de recombinación. Contrario a ello, nuestra hipótesis propone que la unión del IHF a las IS1 de los plásmidos FII bloquea la recombinación de ambas secuencias.

La unión del IHF al DNA induce cambios en su topología; estos cambios son necesarios, por ejemplo, para la interacción de algunas proteínas con el DNA (Drlica y Rouviere-Yaniv, 1987), pero también es factible que la unión IHF-IS₁ bloquee la interacción de las enzimas de recombinación sobre las IS₁.

Debido a ello, en este trabajo se probó la hipótesis de que la unión de IHF-IS₁ en *E. coli*, y una posible falta de interacción en *S. typhimurium* puede ser la causa de que los plásmidos FII se comporten de una manera distinta en ambas bacterias.

Recientemente se reportó que también existe un IHF en *S. typhimurium* similar al de *E. coli*. Sin embargo, el análisis de la secuencia del gen *himA* de *S. typhimurium*, revela diferencias en tres aminoácidos, con respecto al gen homólogo en *E. coli* (Li et al., 1989). No se hallaron referencias de la secuencia genómica de la otra subunidad de IHF de *S. typhimurium* (*himD/hip*). La unión del IHF a la secuencia IS₁ fue estudiada solamente con el IHF e IS₁ de *E. coli* y se sabe que una interacción proteína-DNA sitio-específica, como lo es la del complejo IHF-IS₁, puede modificarse al cambiar un sólo aminoácido en la secuencia de la proteína (Lewin, 1987). Por lo tanto es factible pensar que la afinidad de unión IHF-IS₁ sea menor en *S. typhimurium*.

El IHF influye en la topología del DNA. Este cambio conformacional puede influir directamente en el SE del DNA (Pettijohn, 1988). Posiblemente sea ésta la vía a través de la cual altera la expresión de algunos genes y la capacidad de recombinar de algunas secuencias (Friedman, 1988). La disminución de la enzima girasa en mutantes IHF⁻ puede producir un cambio en la topología del DNA de estas bacterias (Gellert, 1983). Esta enzima es una topoisomerasa tipo II cuya función es la de regular el superenrollamiento (SE) del DNA bacteriano, mediante la adición de supervueltas en sentido negativo, es decir, superenrolla el DNA (Lewin, 1987). Por lo tanto, es posible que el grado de SE de las cepas IHF⁻ sea menor al de las cepas silvestres.

El grado de SE es un factor importante para la recombinación generalizada: un mayor grado de SE negativo facilita la recombinación. Evidencias de ello son: 1) La recombinación que involucra al fago lambda superinfectante UV-irradiado no puede llevarse a cabo cuando la actividad de la girasa se encuentra afectada. 2) Los inhibidores de la enzima girasa reducen la recombinación intramolecular en plásmidos en un sistema recA-dependiente in vitro. 3) La recombinación post-conjugacional se reduce en mutantes gyrB. El SE también es necesario para la recombinación sitio-específica que incluye la integración y excisión del fago lambda, así como la resolución de cointegrados a través de transposones: la actividad de la resolvasa de Tn₃ se favorece al incrementar el SE. La recombinación ilegítima al parecer es estimulada al incrementar el SE (Drlica, 1984). En

cuanto a la influencia de la girasa en la recombinación generalizada intraplasmídica en un sistema in vitro, en ese trabajo se sugiere que la función de esta enzima puede ser mantener el grado de SE del DNA necesario para un buen funcionamiento de las enzimas de recombinación (RecA, RecBCD y RecF), pero no se descartó la posibilidad de que la girasa tenga otra función que no sea incrementar el SE del DNA, ya que cuando el DNA se relajó, aún se observó un 20% de la recombinación (Kolodner, 1980).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, es posible que el SE del DNA esté involucrado en la recombinación de las IS₁ de los plásmidos FII. Por esta razón, en este trabajo hicimos un análisis del grado de SE de una cepa IHF⁻. Además hicimos pruebas de la recombinación de las IS₁ en bacterias con distintos grados de SE.

Nuestro objetivo general fue profundizar en el conocimiento de los mecanismos que generan rearrreglos moleculares en plásmidos de multiresistencia a antibióticos; en lo particular, intentamos probar la hipótesis de que en E. coli la recombinación de las IS₁ de los plásmidos FII está bloqueada por la unión del IHF a estas secuencias, así como estudiar el papel del grado de SE del DNA en este evento de recombinación.

III. MATERIAL Y METODOS

A) MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Los medios de cultivo se esterilizaron en el 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 ₂ O	1	Lt

Medio de Dilución (MD)

MgSO ₄ ·7 H ₂ O	2.5	g
H ₂ O	1	Lt

Placas de Agar (L1)

Bacto agar	20	g
Medio LB	1	Lt

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	[200 µg/ml]
cloramfenicol	[25 µg/ml]
espectinomicina	[25 µg/ml]
estreptomocina	[50 µg/ml] y [200 µg/ml]
kanamicina	[25 µg/ml] y [50 µg/ml]
ácido nalidixico	[20 µg/ml]
tetraciclina	[10 µg/ml], [12.5 µg/ml] y [25 µg/ml]

Medio McConkey

50 g de Medio McConkey / Lt de H₂O

Placas de medio mínimo (M1)

NH ₄ Cl	1.0	g
KPO ₄	3.0	g
NaPO ₄	6.0	g
NaCl	0.5	g
Bactoagar	20.0	g
Dextrosa 20%	10.0	ml
MgSO ₄ 25%	1.0	ml
Vitamina B ₁ 0.1%	0.16	ml
H ₂ O	1	Lt

Medio Luria-Maltosa

Maltosa 20%	1	ml
Medio LB	100	ml

Medio de Dilución para fagos (SM)

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

Agar Blando

Bactoagar	7	g
NaCl	8	g
Medio LB	30	ml
H ₂ O	1	Lt

Medio para almacenar cepas en condiciones
de micro-aerofilia (STAB)

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

Se vaciaron 2 ml de medio por tubo delgado de 4 ml.

Medio Fry

Extracto de carne	10	g
Bactopeptona	5	g
NaCl	10	g
Bactoagar	14	g
H ₂ O	1	Lt

Medio Luria Calcio

CaCl ₂ 0.25 M	5	ml
Dextrosa 20%	5	ml
Medio LB	500	ml

TE

Tris-HCl [pH 8.0]	10	mM
EDTA [pH 8.0]	1	mM

TBE

Tris-HCl [pH 8.3]	90	mM
Borato	90	mM
EDTA	10	mM

BA 10X

Trizma base	0.5 M
EDTA	0.02 M
Acetato de sodio	0.2 M
NaCl	0.18 M

SSC 20x

NaCl	3.0 M
Citrato de sodio	0.3 M

Se ajustó a pH 7.0 con NaOH (10 N)

COLORANTE DE FICOLL

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

SOLUCION HM-50 PARA PREHIBRIDIZACION DE DNA

PVP (polivinilpirrolidona)	0.1 g
Ficoll	0.1 g
BSA (seroalbumina bovina)	0.1 g

Se disolvieron en 25 ml de H₂O y se le agregaron 10 µl de DEPC. Posteriormente se agregaron:

SSC 20x	125	ml
SDS 10%	10	ml
Formamida	250	ml
H ₂ O	80	ml

B) CEPAS BACTERIANAS, PLASMIDOS Y FAGOS

Las cepas bacterianas, plásmidos y fagos utilizados en el presente trabajo se enlistan en la Tabla I.

TABLA 1. CEPAS Y PLASMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

CEPA	CARACTERISTICAS	FUENTE
<u>Escherichia coli</u>		
K37	Protótrofa, Lac ⁺ , HimA ⁺ , Sm ^r	H. Miller
K1299	Protótrofa, Lac ⁺ , <u>himA</u> , Sm ^r , Tc ^r	idem
GM33	Protótrofa, F ⁻ , Lac ⁻ , Dam ⁻	M. Marinus
C600	Auxótrofa, F ⁻ , Lac ⁻ , lambda ⁻	C. Gomez E.
HB101	Auxótrofa, F ⁻ , Lac ⁻ , lambda ⁻ , RecA ⁻ , Sm ^r	F. Bolivar
KL16	Hfr	F. Bastarrachea

Salmonella thiphymurium

Su695	Auxótrofa, Lac ⁻ , Nal ^r	G. Alfaro
-------	------------------------------------------------	-----------

PLASMIDO	CARACTERISTICAS	FUENTE
R1-19	Ap ^r , Sm ^r -Sp ^r , Su ^r , Cm ^r , Km ^r	G. Alfaro
pMS01	Ap ^r y Tc ^r , derivado de pBR322	J. Martinez S.
pBX404-7	Tc ^r y con un gen inactivo para Km ^r	idem

FAGO	CARACTERISTICAS	FUENTE
LAMBDA <u>λ</u> 434 <u>cII</u> ₈₀	Lítico en cepas IHF ⁺ y IHF ⁻	G. Guarneros
LAMBDA <u>λ</u> 434 <u>cIN</u> <u>cII</u> ₈₀	Lisogénico en cepas IHF ⁺ Lítico en cepas IHF ⁻	idem
R17	Lítico en cepas Hfr ó F ⁺	G. Alfaro

C) METODOS DE GENETICA BACTERIANA

1. 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 un volumen de 2-3 ml de medio Luria (LB) el cual se incubó sin agitación a 37°C de 14 a 18 hrs.

Los cultivos bacterianos se hicieron en general inoculando una alicuota del precultivo en LB en una proporción de 1:100. Para ello se utilizaron tubos de ensayo de 20 ml ó matraces nefelométricos (con brazo lateral) de 125 ml, con un máximo de 10 y 50 ml de cultivo, respectivamente. Se incubó con agitación constante a 200 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 ($DO_{550\text{ nm}}$) en un espectrofotometro. La lectura se realizó en el matraz nefelométrico ó en tubos de ensayo de 8 ml.

2. CONSERVACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS

La conservacion de las bacterias por periodos largos. se llevo a cabo en condiciones de micro-aerofilia. A partir de un cultivo en medio solido, una muestra del cesped bacteriano se sembró por piquete en un tubo (STAB) el cual se tapo y selló con parafina. Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente en la obscuridad.

3. OBTENCION DE CUENTAS VIABLES

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

Siempre se determinó la $DO_{600\text{ nm}}$ del cultivo bacteriano a analizar, el cual se diluyó en MD. Las diluciones adecuadas para obtener colonias aisladas fueron: a una $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0.2 y 0.4, 10^{-4} y 10^{-5} , y a $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0.5 y 1.0, 10^{-3} y 10^{-6} . Se sembraron en L1, 100 μ l de cada dilución por espatulado con una varilla de vidrio en forma de L. Las placas se incubaron a 37°C de 14 a 18 hrs. con el fin de obtener colonias aisladas. A partir 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:

$$\text{Células / ml} = \text{Número de colonias por placa} \times 10 \times \text{Factor de dilución}$$

4. CONJUGACION BACTERIANA

En este trabajo se utilizaron dos métodos de conjugación:

a) Conjugación no cuantitativa.

El método utilizado 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 $DO_{600\text{ nm}} = 0.2$ (Fase de crecimiento

exponencial, aproximadamente 5×10^7 células viables / ml). Se mezcló 1 ml de cada cepa en un tubo de ensayo y se incubó a 37°C sin agitación durante 1 hora.

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 dá a través de la producción de la enzima β -lactamasa. Esta enzima es muy eficiente para degradar a la ampicilina 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 μl 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°C de 14 a 18 hrs. Se eligieron algunas colonias exconjugantes al azar y se verificó su fenotipo en los antibióticos adecuados.

b) Conjugación cuantitativa.

Se cultivó cada cepa bacteriana hasta una densidad celular aproximada de 1×10^8 cél/ml. Un ml de este cultivo se colocó a 4°C . A partir de esta alicuota se hicieron cuentas viables del cultivo de cada cepa con el fin de calcular el número de bacterias / ml.

utilizadas para la conjugación. Como control, se sembraron 100 μ l del cultivo sin diluir y de una dilución 10^{-1} en medio con el antibiótico usado para seleccionar a las exconjugantes. Esto es con el fin de cuantificar las posibles mutantes espontáneas resistentes a los antibióticos utilizados en los medios selectivos.

Se mezclaron en un matraz la cepa donadora y la receptora en una relación 1:10. La mezcla de conjugación se incubó sin agitación a 37°C por 1 hr. Al finalizar este tiempo se interrumpió la conjugación mediante agitación con vórtex e incubación en hielo.

Una alícuota de 1ml se diluyó 10^{-1} en LB y se incubó 1 hr a 37°C para permitir a las exconjugantes expresar el fenotipo de los genes de resistencia. Después de incubarse el cultivo se hicieron diluciones 10^{-1} a 10^{-3} en MD y se sembraron 100 μ l de cada una en el medio selectivo para las exconjugantes.

5. TRANSFORMACION BACTERIANA

Se llevo a cabo en dos pasos:

a) Preparación de células competentes.

A partir de un precultivo fresco se hizo un cultivo de 10 ml de la cepa a transformar, inoculando el precultivo en 100 partes de LB y se incubó hasta llegar a una $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0.2$

Al llegar a esa DO, el cultivo se enfrió en hielo durante 10 min. Se centrifugó a 4000 g, a 4°C durante 5 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 5 ml de CaCl_2 [50 mM] a 4°C , y se mantuvo en hielo durante 15 min.

Se volvió a centrifugar y se resuspendió en 0.66 ml de una solución de CaCl_2 [50 mM], en la cual se incubó a 4°C de 12 a 24 hrs.

b) Transformación de las células competentes.

Se mezclaron en un tubo de ensayo 0.2 ml de células competentes y el DNA (40 a 500 ng en 100 μl de TE). Se incubó en hielo por 30 min, transcurridos los cuales se incubó a 42°C por 2 min. Inmediatamente después se mezcló con 1 ml de LB y se incubó a 37°C sin agitación por 30 min. para seleccionar a las células resistentes a tetraciclina (Tc^r), ó por 1 hr. para las resistentes a ampicilina (Ap^r).

Para seleccionar Tc^r se mezcló todo el cultivo con 3 ml de agar blando fundido a 45°C y se vació en una placa de agar con tetraciclina [12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$]. En el caso de selección para Ap^r se diluyó 10 y 100 veces y se sembraron 100 μl de cada dilución en una placa de agar con ampicilina. Se incubó de 12-24 hrs. y se seleccionaron las colonias transformantes.

6. PRUEBA DE LA ESTABILIDAD DEL PLASMIDO R1-19

Para realizar estos experimentos se construyeron por conjugación las siguientes cepas:

Escherichia coli:

K37 / R1-19
K1299 / R1-19
GM33 / R1-19

Salmonella typhimurium

Su695 / R1-19

Estos experimentos se hicieron a partir de precultivos frescos ajustados a una $DO_{550\text{ nm}} = 0.2$ con LB. Los cultivos se hicieron inoculando 10 μl del precultivo, en 50 ml de LB (dilucion 1:5,000). Previamente se calculó que el número de células viables en 50 μl a esta DO es de 1×10^6 .

El cultivo se incubó en matraz nefelométrico de 125 ml, a 37°C con agitación constante a 100 ó 200 rpm (ver resultados).

Cada 12 hrs se diluyó una parte del cultivo con medio LB hasta llevarlo a una $DO_{550\text{ nm}} = 0.2$. Con 10 μl de este cultivo diluido se inocularon 50 ml de LB fresco y se incubó nuevamente a 37°C con la misma agitación. La DO alcanzada por cada subcultivo antes de diluir osciló entre 0.55 y 0.8 como máximo.

En el caso de las pruebas realizadas con E. coli, los marcadores de resistencia a antibióticos presentes en el plásmido y en cada cepa se verificaron cada cuatro subcultivos. En el caso de las pruebas con S. typhimurium se verificaron cada subcultivo pues la frecuencia de recombinación de esta bacteria es mucho mayor que la de E. coli.

La prueba de marcadores de resistencia se describe a continuación.

7. DETERMINACION DEL PATRON DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

A partir de un cultivo ajustado a $DO_{550\text{ nm}} = 0.2$, se hicieron diluciones 10^{-4} y 10^{-9} en MD. Se espatularon 100 μl en placas con L1 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.

8. PRUEBA DE SENSIBILIDAD AL FAGO R17

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_{600 nm} = 0.6. Se sembraron 100 ul de este en una caja de medio Fry y se incubó bajo la flama de un mechero hasta que se seco el inóculo. Una vez seco, se colocaron 20 ul de dilucion 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.)

9. TITULACION DEL FAGO LAMBDA

Se titularon dos cepas del bacteriófago lambda: λ 434cII₆₆ e λ 434cII₆₆ 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 cespel 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:

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

10. VERIFICACION DEL FENOTIPO HimA⁺ Y HimA⁻

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⁺ y IHF⁻ (himA⁻ ó himD/hip⁻). La metodología utilizada fué la siguiente:

Se preparó un cultivo de la cepa K1299 (IHF⁻), así como de un control IHF⁺ en medio Luria-Maltosa, hasta llegar a una DO_{600 nm} ≈ 0.6. Se sembraron 100 µl de este cultivo en placas de L1 y se dejó secar. Se colocaron 20 µl 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.).

11. OBTENCION DE MUTANTES ESPONTANEAS RESISTENTES A ANTIBIOTICOS

En algunos estudios realizados en este trabajo se utilizaron bacterias mutantes resistentes a algún antibiótico. Para ello se siguió la siguiente técnica:

Se hizo un cultivo de la cepa requerida en LB. Se incubó hasta que alcanzó una alta densidad celular (>1x10⁸ cél/ml). Se sembraron por espatulado 100 µl de este cultivo en una placa con el antibiótico seleccionado y se incubó a 37°C de 12 a 18 hrs.

Se aislaron algunas colonias resistentes al antibiótico y se verificó su fenotipo probando su patrón de resistencia.

12. CALCULO DE LAS BACTERIAS RESISTENTES A UN ANTIBIOTICO EN UN CULTIVO

Para probar la frecuencia de aparición de mutantes espontáneas resistentes algún antibiótico en un cultivo, primero se ajustó el cultivo con LB hasta una DO_{600 nm} = 0.3 ó 0.5 en el caso de cepas RecA⁻ y se incubó en hielo. El cultivo se diluyó en MD frío de 10⁻¹ hasta 10⁻⁹.

Se sembró por espatulado una alícuota de 100 μ l de las diluciones 10^{-4} y 10^{-2} en L1 y 100 μ l del cultivo sin diluir y de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en placas con el antibiótico cuya resistencia se estuviera probando.

Se incubó a 37°C de 14-16 hrs y se contó el número de colonias en las cajas de L1 (células totales / ml) y en las cajas con antibiótico (células resistentes / ml).

D) METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

1. VISUALIZACION DE LOS PLASMIDOS

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 $DO_{600\text{ nm}} > 1.0$ (Fase estacionaria con 14 a 18 hrs de cultivo). Los cultivos se centrifugaron en microcentrifuga a 10,000 rpm por 2 min. Las células concentradas en la pastilla se lisaron con la enzima lisozima, 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 10,00 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 μl 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 BA 1x 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$] por 45' y se fotografió con 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 (Martinez, 1983) con marcador de resistencia Ap^r . Este plásmido se introdujo en las cepas por transformación con CaCl_2 . 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 _{660nm} =	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 μ l de TE y se le añadieron 2 μ l de colorante de Ficoll.

Se hizo un gel de agarosa al 1% en TBE con Fosfato de Cloroquina [25 μ 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 µg/ml] por 30 min y se lavó 10 min en agua corriente, para quitar el exceso de colorante. Se fotografió con luz ultravioleta.

2. HIBRIDIZACION DE DNA-DNA EN FILTRO DE NITROCELULOSA (HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN)

Esta técnica se llevó a cabo en cuatro etapas, las cuales se describen a continuación.

a) Marcaje radioactivo del DNA.

El marcaje con α -[³²P]-dATP del plásmido pMS01 se efectuó utilizando el sistema de "Nick Translation" de BRL. La metodología que se siguió fué la siguiente.

Se hizo la siguiente mezcla de reacción en un tubo Eppendorf:

Sol. E (H ₂ O)	29 µl
Sol. A1 (dCTP, dGTP, dTTP)	5 µl
DNA (1 µg de pMS01)	2 µl
α -[³² P]-dATP	4 µl
Sol. C (DNA-pol I/DNasaI)	5 µl

Se incubó a 15°C por 60 minutos. Para detener la reacción se agregaron 5 µl de Sol. B (Stop Buffer).

Se separó el plásmido marcado de los nucleótidos no incorporados por medio de dos precipitaciones con 2 volúmenes de etanol más 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5 M.

b) Transferencia del DNA del gel
al filtro de nitrocelulosa.

Se corrió el gel de agarosa normalmente y se tiñó con Bromuro de Etidio para fotografiarlo. Se enjuagó con 300 ml de agua destilada durante 30 min.

A temperatura ambiente, se incubó en 300 ml de HCl 0.25 N con agitación lenta por 10 min; se enjuagó con agua destilada y se incubó en 300 ml de NaOH 0.5 M, NaCl 1 M para desnaturalizar al DNA, con agitación por 30 min; en seguida en 300 ml de Tris 0.5 M, NaCl 1.5 M [pH 7.4] con agitación por 30 min. y posteriormente en 300 ml de SSC 6x por 10 min sin agitación.

Se montó un dispositivo para la transferencia del DNA del gel de agarosa al papel de nitrocelulosa. Para ello se colocaron los siguientes elementos en el orden descrito (de arriba hacia abajo):

matraz con 500 ml de agua
vidrio
colchón de papel absorbente
filtro Whatman 3MM
filtro de nitrocelulosa
gel de agarosa (invertido)
filtro Whatman
filtro Whatman con los extremos inmersos en el tanque
vidrio
tanque con SSC 6x

Se dejó transferir durante 16 hrs. El filtro de nitrocelulosa se secó entre dos papeles Whatman 3MM. Se envolvió en papel aluminio y se incubó a 80°C en vacío durante 2 hrs.

c) Prehibridización del filtro.

Se llevó a cabo para evitar la hibridización inespecífica de algún fragmento radioactivo.

Para ello se introdujo el filtro de nitrocelulosa con el DNA transferido en una bolsa de plástico y se agregaron 8 ml de HM-50 con DNA de timo de ternera a una concentración final de 1.6 $\mu\text{g/ml}$ de HM-50. El DNA de timo se desnaturalizó a 100°C por 10 min antes de agregarlo al HM-50. Se selló la bolsa y se incubó aproximadamente 16 hrs a 42°C con agitación lenta.

d) Hibridización del filtro con DNA radioactivo.

Se agregó a la bolsa de prehibridización el DNA marcado con α -[³²P]-dATP. Se selló la bolsa y se incubó a 42°C por 20 hrs.

Se sacó el filtro de la bolsa y se lavó en SSC 2x, SDS 0.5% a temperatura ambiente por 5 min. Se pasó a una solución de SSC 2x, SDS 0.1% por 15 min. y acto seguido a una solución de SSC 0.1x, SDS 0.5% donde se incubó a 55°C con agitación lenta por 2 hrs. Finalmente se incubó en SSC 0.1x a 55°C con agitación lenta por 30 min. Se secó entre dos hojas de papel Whatman 3MM a temperatura ambiente por 16 hrs. y se hizo la autorradiografía del filtro con película Kodak X-Omat S XS-5 con tiempos de exposición variables.

IV. RESULTADOS

A) DISOCIACION DEL PLASMIDO FII R1-19 EN E. coli

HimA⁺ Y HimA⁻

Con el fin de probar la hipótesis de que en E. coli la interacción del heterodímero IHF con los extremos de la IS₁ bloquea la recombinación de estas secuencias presentes en los plásmidos del grupo FII, se analizó la frecuencia de disociación del plásmido R1-19 en la cepa K1299 HimA⁻ (IHF⁻).

El plásmido R1-19 contiene en su secuencia tres IS₁ las cuales flanquean a diferentes genes de resistencia a antibióticos (Fig. 7). Este plásmido es un buen modelo para estudiar los rearrreglos entre IS₁, ya que el análisis de los fenotipos resultantes permite identificar tres eventos diferentes de recombinación entre estas secuencias. Las tres posibles recombinaciones y los fenotipos resultantes en cada una de ellas se enlistan a continuación:

- 1) Recombinación entre IS_{1b}-IS_{1c}: fenotipo Ap^r Sm^r-Sp^r Su^r Cm^r.
- 2) Recombinación entre IS_{1a}-IS_{1c}: fenotipo Km^r.
- 3) Recombinación entre IS_{1a}-IS_{1b}: fenotipo Multisensible.

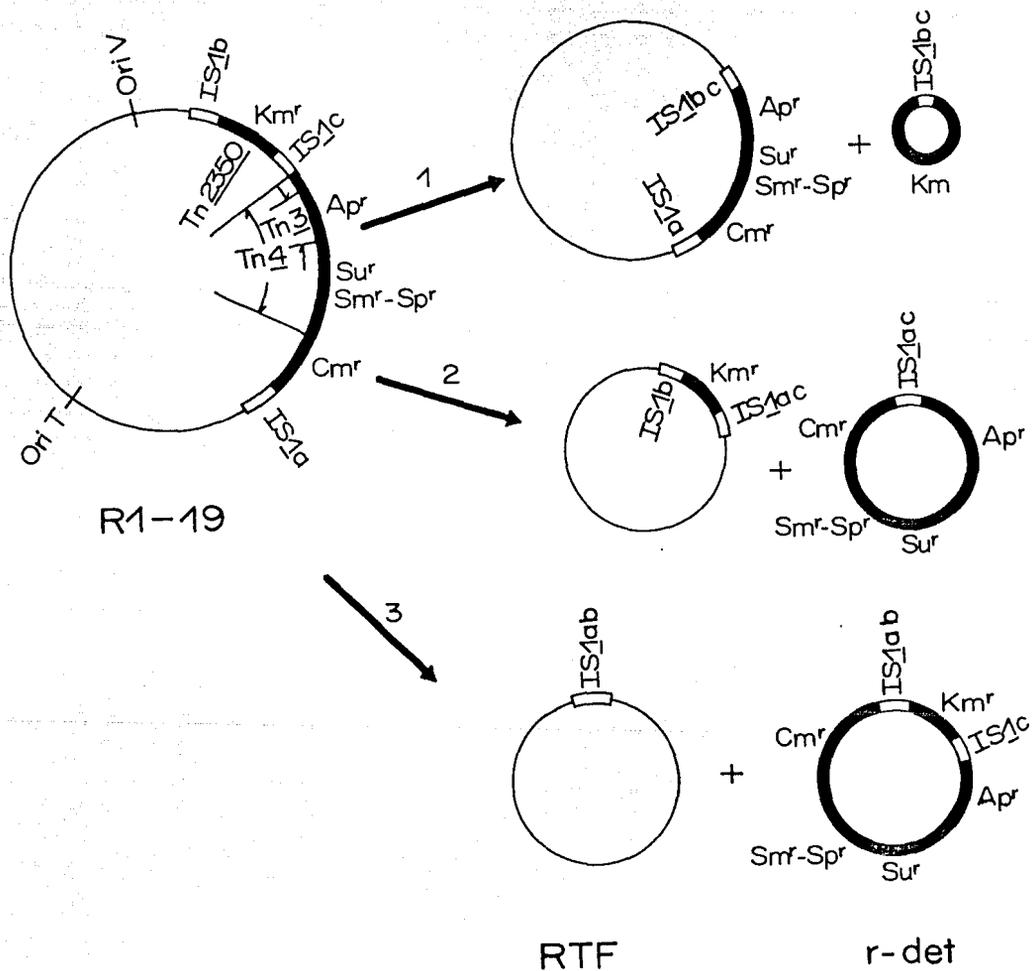


Figura 7. Posibles eventos de disociación del plásmido FII R1-19 a través de sus IS1. El evento 1 produce células *Apr^r*, *Sur^r*, *Smr-Spr^r*, *Cmr^r*; el evento 2, células *Kmr^r*; el evento 3, células multisensibles.

Se eligió la cepa K1299, pues tiene una mutación por deleción en el gen himA. Debido a este hecho, el dímero IHF formado por los productos de himA y de himD/hip no se encuentra presente en el citoplasma de la bacteria (Friedman, 1988). Es importante destacar que al tener una mutación por deleción se descarta la posibilidad de que en un experimento tan largo como el presente se obtengan revertantes espontáneas HimA' lo que podría alterar los resultados.

Como control experimental se utilizó la cepa K37, isogénica de la K1299, pero himA', y la cepa GM33 dam-3 que manifiesta un comportamiento hiper-recombinante (hiper-rec) (Marinus y Konrad, 1976). La cepa GM33 dam- recombina el plásmido con una frecuencia relativamente alta (Gómez y Torres, 1983). El comportamiento del R1-19 en esta cepa se tomó como control para determinar el tiempo de cultivo necesario para detectar eventos de recombinación entre las IS₁ en E. coli.

Se constuyeron por conjugación las cepas K37/R1-19, K1299/R1-19 y GM33/R1-19 y se analizó la frecuencia de disociación del R1-19 en estas cepas (Material y Métodos). Cada cuatro subcultivos se determinó el patrón de resistencia a kanamicina (Km), ampicilina (Ap), espectinomicina (Sp) y cloramfenicol (Cm) en una muestra de los cultivos bacterianos, hasta llegar a un total de aproximadamente 225 generaciones.

En la Tabla II se muestran los resultados de dos experimentos.

TABLA II. FRECUENCIA DE LOS PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS DERIVADAS DEL EXPERIMENTO DE ESTABILIDAD DEL PLASMIDO FII, R1-19 EN Escherichia coli. *

PATRON DE RESISTENCIA	K37/R1-19 (HimA ⁺)		K1299/R1-19 (HimA ⁻)		GM33/R1-19 (Dam ⁻)	
	A	B	A	B	A	B
	Multirresistente	90	85	51	41	48
Multisensible	3	7	46	58	36	34
AP ^r Sp ^r Cm ^r	3	3	1	0	0	2
Km ^r	0	0	0	0	0	0
Otros	4	5	2	1	16	6

*Los números representan valores en por ciento. Las columnas A y B muestran los porcentajes obtenidos en dos experimentos diferentes, después de aproximadamente 200 generaciones. Los cultivos se realizaron con 50 ml de LB a 100 rpm de agitación.

En esta Tabla se puede observar que en la cepa K1299/R1-19 himA⁻, la proporción de bacterias multisensibles fue significativamente mayor al observado en la cepa K37/R1-19, e incluso mayor al de la cepa GM33/R1-19. La proporción de bacterias multisensibles es un indicador indirecto de los eventos de recombinación intraplasmídica entre las IS_{1a}-IS_{1b}. En la Figura 8 se pueden observar las gráficas de la pérdida de los marcadores del r-det durante ambos experimentos.

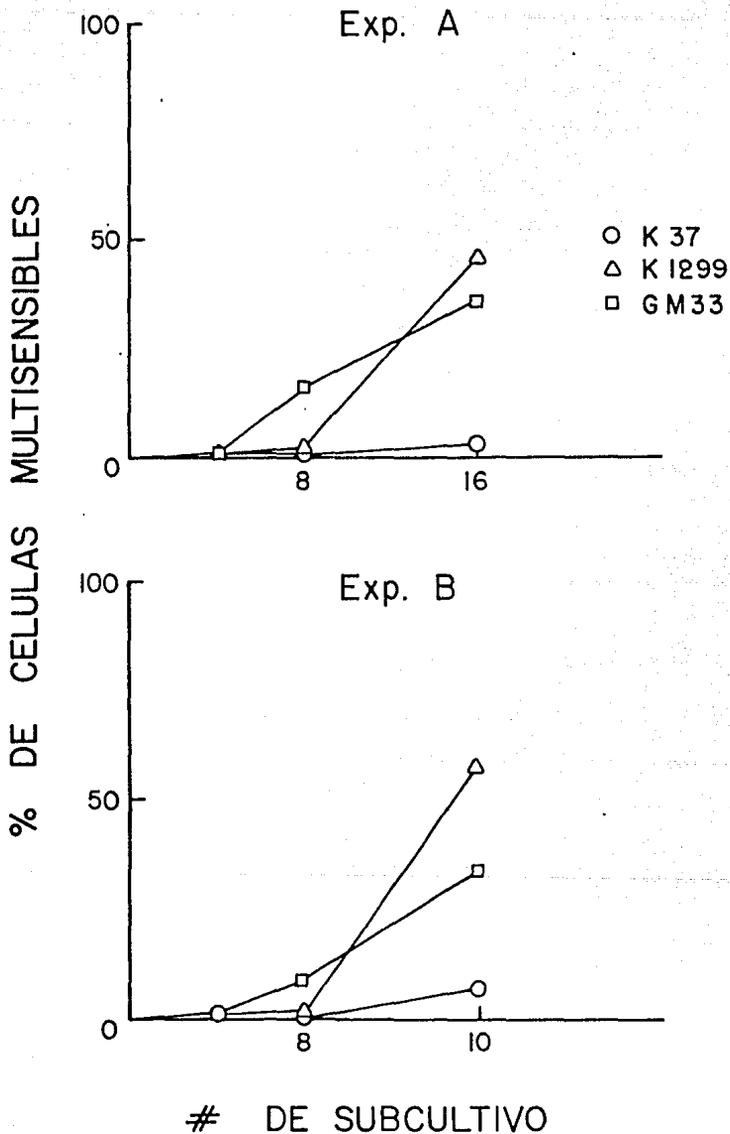


Figura 8. Pérdida de los marcadores de resistencia a antibióticos del r-det del plásmido R1-19.

Para comprobar que la pérdida de los marcadores de resistencia en las células multisensibles derivadas de la K1299/R1-19 se debe a la recombinación entre las IS₁ y no a la pérdida total del plásmido, se determinó la presencia del RTF del plásmido utilizando el fago R17 y además por su visualización en gel (Material y Métodos). En siete cepas multisensibles derivadas de la K1299/R1-19 se observó la presencia de un plásmido de tamaño similar al RTF (Fig. 9). Este resultado prueba que la pérdida de los marcadores de resistencia del plásmido se debe a su disociación por recombinación de sus IS_{1a}-IS_{1b}.

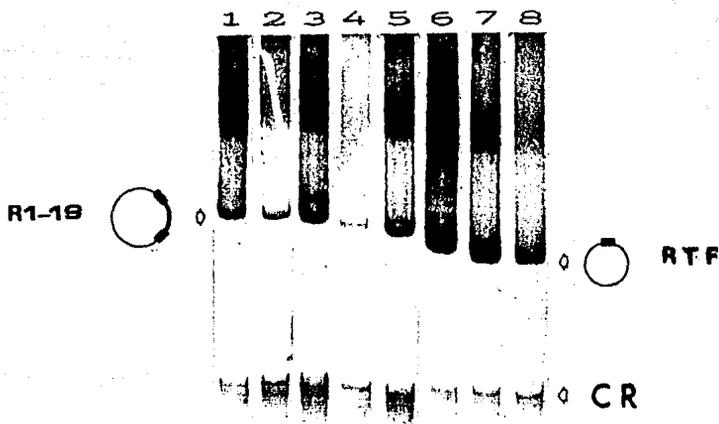


Figura 9. Electroforesis en agarosa al 1% de los plásmidos presentes en las cepas derivadas de la K1299/R1-19 al final del experimento de estabilidad. 1, 2 y 3, células multirresistentes; 4, Ap^r, Su^r, Sa^r-Sp^r, Ca^r; 5, Km^r, Ap^r; 6, Ap^r; 7 y 8, células multisensibles.

En la Tabla II puede verse además que en la cepa K1299 el evento más frecuente fue la recombinación entre las dos IS₁ más alejadas. El fenotipo Ap^r Sp^r Cm^r que puede generarse por la recombinación entre las IS_{1b}-IS_{1c}, se detectó a muy baja frecuencia ó no se detectó y no se detectaron células con recombinación entre IS_{1a}-IS_{1c} (fenotipo Km^r) (Tabla II).

Además de los fenotipos esperados, se encontraron al final del experimento algunas cepas con patrones de resistencia distintos a los esperados: Ap^r Sp^r Km^r, Sp^r Cm^r, Ap^r Km^r, Ap^r Cm^r y Ap^r.

Se decidió estudiar si en la cepa Ap^r derivada de la K1299/R1-19, el transposón Tn₃ se encontraba aún en el plásmido ó si se había movilizado al cromosoma bacteriano. La resistencia a ampicilina conferida por este plásmido se debe a la inserción del transposón Tn₃ en su r-det (Fig. 7).

Para ello se estudió si la resistencia a ampicilina podía transferirse por conjugación a otra cepa. Un resultado positivo mostraría que el Tn₃ se localizaba aún en el plásmido. Se utilizó a la cepa C600 Nal^r Ap^r como receptora. Esta cepa se construyó como se describe en Material y Métodos. Se realizó una conjugación con la técnica no cuantitativa aquí descrita, y las exconjugantes se aislaron en placas con ampicilina y ácido nalidixico (Nal). De esta manera, solamente podrían crecer en este medio las bacterias Nal^r Ap^r, es decir, las bacterias C600 exconjugantes que adquirieran la resistencia a ampicilina por

medio de la transferencia del derivado del plásmido. El resultado fue la adquisición de resistencia a ampicilina en la cepa C600 exconjugante. Esto indicó que el Tn_3 permaneció dentro del plásmido en la cepa K1299/R1-19 Ap^r derivada del experimento de estabilidad. Un análisis posterior del plásmido por electroforesis apoyó este resultado (Fig. 9).

Al final del experimento de estabilidad se verificó el fenotipo HimA⁻ (IHF⁻) tanto de las cepas iniciales como de las derivadas. Esta prueba se hizo con el fin de descartar la posibilidad de bacterias contaminantes, debido a que este experimento implicó la realización de varios subcultivos y el crecimiento prolongado de las bacterias. Para ello se utilizaron dos mutantes del bacteriófago lambda que inducen una lisis diferente en las cepas HimA⁺ y HimA⁻ (Tabla I; Material y Métodos). El resultado confirmó que tanto la K1299 como las cepas derivadas de ella al final del experimento de estabilidad del R1-19, eran IHF⁻.

La metodología utilizada se describe en este trabajo. Las bacterias se cultivaron en medio Luria Maltosa con el fin de inducir el operón maltosa que contiene el gen lamB, el cual codifica para el receptor del bacteriofago lambda.

En resumen, la recombinación entre las IS₁ del plásmido FII R1-19, se ve incrementada en la cepa de E. coli K1299 HimA⁻ (IHF⁻). Esta cepa disocia a este plásmido a una frecuencia mayor que la encontrada en la cepa hiper-rec GM33 Dam⁻.

B) EFICIENCIA DE RECOMBINACION HOMOLOGA

EN E. coli HimA⁻.

Esta serie de pruebas se hizo con el fin de descartar la posibilidad de que la cepa K1299 utilizada en nuestro experimento de estabilidad, presentara un comportamiento de alta recombinación homóloga. El comportamiento hiper-recombinante ha sido observado en algunas cepas mutantes de E. coli como las dam-3, polA1 y lig (Gómez y Torres, 1983). Aún no se conoce el mecanismo molecular por el cual recombinan algunas secuencias de DNA en estas cepas más que en otras. Estas cepas tienen un DNA con un mayor número de cortes de cadena sencilla, y se ha propuesto que este es un mejor sustrato para las enzimas de recombinación (Lewin, 1987). Fué necesario descartar que la cepa K1299 (IHF⁻) fuera una cepa hiper-recombinante, pues lo que proponemos es que la alta frecuencia de recombinación del R1-19 en ella, se debe a que, al no estar presente el factor IHF, las secuencias IS₁ no se encuentran bloqueadas y si pueden actuar sobre ellas las enzimas de recombinación.

Debido a que no se hallaron reportes de que la cepa K1299 fuera hiper-recombinante, se decidió estudiar su eficiencia de recombinación y compararla con la de la cepa silvestre K37. Para ello se estudió la frecuencia de mutación espontánea, la frecuencia de recombinación intra e interplasmídica y la frecuencia de recombinación cromosómica postconjugacional en ambas cepas.

1. FRECUENCIA DE MUTACION ESPONTANEA A Nal^r.

Se ha reportado que las cepas que presentan un comportamiento hiper-rec, también presentan una frecuencia mayor de mutaciones espontáneas (Marinus y Konrad, 1976), la cual también es consecuencia de presentar un DNA con un mayor número de cortes.

Se calculó la frecuencia de mutación espontánea en la cepa K1299, ya que esta frecuencia permite conocer de una manera indirecta si una cepa es Hiper-rec.

Para esto se calculó la frecuencia de mutantes espontáneas resistentes a ácido nalidíxico (Nal^r). Algunas bacterias presentan espontáneamente mutaciones no letales en el gen gyrA que codifica para la subunidad A de la enzima girasa, y pueden crecer en medio con ácido nalidíxico. Estas bacterias sintetizan una enzima girasa funcional, en la que el dominio para la unión del antibiótico a la enzima no es el adecuado por lo que estas bacterias si pueden crecer en presencia del ácido nalidíxico.

La metodología usada se basó en la medición de la frecuencia de aparición de mutantes espontáneas a Nal^r en la cepa K1299. Los controles fueron una cepa silvestre (K37), que presenta una baja tasa de mutabilidad espontánea, y una cepa Dam⁻ (GM33), la cual presenta un comportamiento hiper-mutante (Marinus, 1988).

La prueba se llevó a cabo haciendo un cultivo de 3 ml de las cepas K1299, K37 y GM33 en LB hasta una $DO_{600nm} = 0.5$. El número de células presentes en este cultivo se determinó por la técnica de cuentas viables aquí descrita. Simultáneamente se sembraron 100 μ l de este cultivo en placas con ácido nalidixico, y se incubaron de 14 a 18 hrs con el fin de observar el número de colonias mutantes Nal^r .

En la Tabla III se muestra la frecuencia de mutación de las cepas utilizadas. En ella se puede ver que la frecuencia de mutación de la cepa K1299 es menor que la de la cepa hiper-mutante y similar a la de la K37.

TABLA III. FRECUENCIA DE MUTACION ESPONTANEA A RESISTENCIA AL ACIDO NALIDIXICO (Nal^r).

CEPA	FENOTIPO	FRECUENCIA DE MUTANTES Nal^r *		
		A	B	C
K37	HimA'	$< 3.4 \times 10^{-7}$	$< 3.4 \times 10^{-7}$	2.9×10^{-6}
K1299	HimA ⁻	3.8×10^{-6}	$< 2.6 \times 10^{-7}$	$< 2.6 \times 10^{-7}$
GM33	Dam ⁻	4.1×10^{-6}	1.1×10^{-6}	3.4×10^{-6}

$$* \text{ Frecuencia de mutantes } Nal^r = \frac{\# \text{ de bacterias sembradas}}{\# \text{ de bacterias } Nal^r}$$

Las columnas A, B y C muestran los resultados de tres experimentos diferentes.

2. FRECUENCIA DE RECOMBINACION HOMOLOGA INTRA E INTERPLASMIDICA.

Para realizar esta prueba se utilizó el plásmido pBX404-7 (Fig. 10) (Xu et al., 1988). Este plásmido confiere resistencia a tetraciclina y está construido con un gen de resistencia a kanamicina inactivado debido a que está separado dentro del plásmido. El gen de resistencia a kanamicina está constituido de forma que tiene dos regiones homólogas translapadas separadas y orientadas en forma directa. Cuando ocurre un evento de recombinación intra ó interplasmidica entre estas regiones, este gen se reconstituye y confiere a la bacteria la resistencia al antibiótico. Este evento es dependiente del sistema de recombinación RecA (Xu et al., 1988).

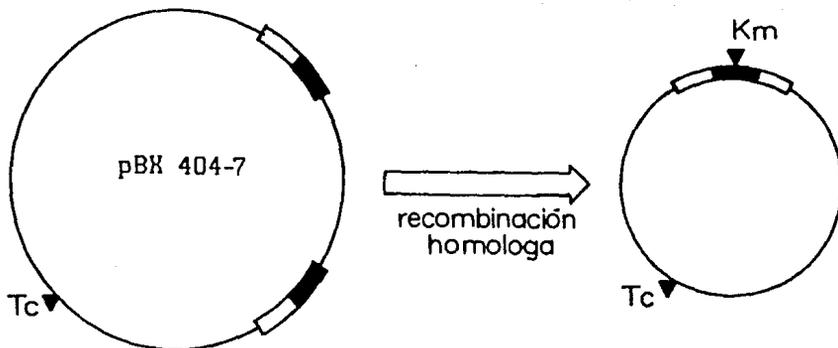


Figura 10. Esquema del plásmido pBX404-7. Las zonas oscuras son las regiones homólogas separadas translapadas del gen de resistencia a kanamicina.

Se utilizaron las propiedades de este plásmido para calcular la frecuencia de recombinación de secuencias homólogas diferentes de IS₁, en un plásmido en la cepa K1299. La frecuencia observada en esta cepa se comparó con la que presentó una cepa silvestre (K37), una cepa hiper-recombinante (GM33), y una cepa RecA⁻ (HB101).

El plásmido se introdujo por transformación en las cepas K1299, K37 y GM33 (Material y Métodos). Las bacterias transformantes se seleccionaron en medio con tetraciclina [12.5 µg/ml]. En la cepa K1299 se comprobó la presencia del plásmido por medio de su visualización, utilizando la técnica previamente descrita. Se aislaron las colonias transformantes y se verificó su patrón de resistencia a antibióticos, así como el fenotipo IHF. No fue necesario transformar la cepa HB101 / pBX404-7, debido a que ésta ya tiene en su interior al plásmido.

A partir del césped bacteriano de una cepa verificada, se hizo un cultivo inicial en 5 ml de LB con tetraciclina [12.5 µg/ml] hasta una DO_{600nm} = 0.3. En el caso de la cepa HB101, por ser ésta una cepa RecA⁻, se necesitó dejar crecer el cultivo hasta una DO_{600nm} = 0.5, ya que en esta DO tiene un número de bacterias viables similar al cultivo de las RecA⁺. Se usó LB con tetraciclina 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°C y con una alícuota del mismo se probó la frecuencia de recombinación del plásmido. A esta frecuencia se le llamó Frecuencia de Recombinación Inicial (F₁).

El evento que indicó la recombinación en el plásmido, fue la adquisición de la resistencia a kanamicina en las bacterias (Material y Métodos).

A partir de la F_1 , 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 alícuota del cultivo a 4°C, y con ellas se inocularon cultivos en LB con 12.5 µg de tetraciclina / ml. El número de bacterias sembrado se verificó haciendo cuentas viables en placas con tetraciclina [12.5 µg/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 6.54×10^{-6} , por lo tanto se incubó hasta que las bacterias alcanzaron una densidad celular de 1×10^8 células / 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.

El experimento se realizó tres veces y los resultados obtenidos fueron similares. Estos resultados se muestran en la Tabla IV y en ellos se puede observar que la frecuencia de recombinación homóloga de la cepa K1299 fue un poco menor a la encontrada en la cepa silvestre K37. Esto significa que la cepa K1299 no presenta un comportamiento hiper-rec, sino por el contrario, recombina las secuencias homólogas a una frecuencia menor que la cepa silvestre.

TABLA IV. FRECUENCIA DE RECOMBINACION ENTRE DOS SECUENCIAS HOMOLOGAS DEL PLASMIDO pBX404-7 (Tc^r)^{a)}.

CEPA	FENOTIPO	FRECUENCIA DE RECOMBINACION INICIAL (F _i)	FRECUENCIA DE RECOMBINACION FINAL (F _f)		
			A	B	C
K37	HimA ⁺	4.4x10 ⁻⁴	1.3x10 ⁻³	1.3x10 ⁻³	1.4x10 ⁻³
K1299	HimA ⁻	3.1x10 ⁻⁴	3.5x10 ⁻⁴	7.6x10 ⁻⁴	1.7x10 ⁻⁴
GM33	Dam ⁻	5.1x10 ⁻⁴	1.3x10 ⁻³	1.1x10 ⁻³	1.8x10 ⁻⁴
HB101	RecA ⁻	3.7x10 ⁻⁵	3.2x10 ⁻⁵	3.8x10 ⁻⁵	3.5x10 ⁻⁵

^{a)}La recombinación entre estas secuencias genera un gen funcional de resistencia a Kanamicina.

F_i = $\frac{\# \text{ de bacterias Tc}^r \text{ Km}^r}{\# \text{ de bacterias Tc}^r}$ en el cultivo bacteriano antes del experimento.

F_f = $\frac{\# \text{ de bacterias Tc}^r \text{ Km}^r}{\# \text{ de bacterias Tc}^r}$ en el cultivo bacteriano al final del experimento.

En el caso de la cepa control GM33, ésta debió presentar una frecuencia de recombinación homóloga alta (comportamiento Hiper-rec, Marinus y Konrad, 1976), sin embargo su comportamiento fue similar al de la cepa silvestre. Tal vez este plásmido no sea una herramienta adecuada para medir el comportamiento hiper-rec de una cepa. El grupo de Marinus (1976) describió un aumento en la recombinación cromosoma-plásmido en las cepas Dam⁻; sin embargo no determinó la recombinación plásmido-plásmido; es decir que es posible que el comportamiento hiper-rec sólo se manifieste con secuencias localizadas en el cromosoma. Es por ello que decidimos realizar la prueba de frecuencia de recombinación cromosómica postconjugacional, que se describe a continuación.

3. FRECUENCIA DE RECOMBINACION CROMOSOMICA POSTCONJUGACIONAL.

Este experimento se hizo con el fin de verificar el resultado de frecuencia normal de recombinación homóloga de la cepa K1299, obtenido con la prueba de recombinación en el plásmido pBX404-7 aquí descrita. Esta prueba se basó en el cálculo de la frecuencia de recombinación del cromosoma de una bacteria receptora, con un cromosoma introducido en ella. Para ello se transfirió el cromosoma de una bacteria Hfr a una bacteria receptora, utilizando el método de conjugación bacteriana cuantitativa (Material y Métodos). El indicador de un evento de recombinación cromosómica es la adquisición de alguna característica presente únicamente en el cromosoma Hfr. En nuestro caso, se utilizó la resistencia al ácido nalidixico, que se puede manifestar al mutar el gen gyrA, como se describió anteriormente. Para ello se construyó la cepa KL16 Hfr con fenotipo Nal^r con la técnica descrita. Se aislaron las mutantes y se comprobó que fueran bacterias Hfr por medio de la prueba de sensibilidad al fago R17.

El gen gyrA se localiza en el minuto 48 del cromosoma bacteriano (Bachmann, 1987). La cepa KL16 comienza a transferir su cromosoma en sentido opuesto a las manecillas del reloj al minuto 60 (Low, 1987), por lo cual al realizarse la conjugación cromosómica, el gen gyrA es uno de los primeros en pasar a la bacteria receptora. Al recibir parte del cromosoma con el gen gyrA⁻, las bacterias exconjugantes tienen la posibilidad de

realizar una recombinación homóloga entre ambos cromosomas y de esta manera pueden adquirir el gen mencionado para la resistencia al antibiótico.

Se determinó la frecuencia de recombinación cromosómica postconjugacional de la K1299 con fenotipo $\text{Nal}^{\circ} \text{Sm}^r$, y como controles utilizamos a las cepas K37 $\text{Nal}^{\circ} \text{Sm}^r$, que presenta una frecuencia de recombinación homóloga normal, y la GM33 $\text{Nal}^{\circ} \text{Sm}^r$, cuya frecuencia de recombinación homóloga es alta. La cepa GM33 $\text{Nal}^{\circ} \text{Sm}^r$ se construyó por medio de la técnica de obtención de mutantes espontáneas resistentes a antibióticos, descrita en este trabajo.

Se conjugó la cepa KL16 mencionada con las cepas receptoras mediante la técnica de conjugación bacteriana cuantitativa, descrita en este trabajo. Posteriormente se incubaron las exconjugantes en LB a 37°C por 1 hr con el fin de permitir la realización del evento de conjugación cromosómica y la expresión del gen de resistencia en las bacterias exconjugantes que lo hubieran adquirido por recombinación. Se diluyó el cultivo y se sembró una alícuota en medio con ácido nalidixico y estreptomina, para seleccionar a las exconjugantes recombinantes, como se describe en la parte de metodología.

Para medir la eficiencia de recombinación en cada cepa se utilizó el parámetro "T" el cual representa la frecuencia de recombinación entre el cromosoma de la cepa Hfr y el de la receptora. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.

TABLA V. FRECUENCIA DE RECOMBINACION HOMOLOGA POSTCONJUGACIONAL DE MARCADORES GENETICOS CROMOSOMICOS ^{a)}.

CEPA	FENOTIPO	FRECUENCIA DE RECOMBINACION (T) ^{b)}	
		A	B
K37	HimA ⁺	0.024	0.014
K1299	HimA ⁻	0.011	0.002
GM33	Dam ⁻	<0.001	<0.001

^{a)} El gen gyrA con una mutación no letal (fenotipo Nal^r) se transfirió por medio de un Hfr para la recombinación de secuencias homólogas entre ambos cromosomas.

$$b) T = \frac{\# \text{ de bacterias exconjugantes (Nal}^r) / \text{ml}}{\# \text{ de bacterias donadoras} / \text{ml}} \times 100$$

En ellos se puede ver que la frecuencia de recombinación de la cepa K1299 es menor que la observada en la cepa silvestre K37, lo cual apoya los resultados obtenidos en la prueba con el plásmido pBX404-7. Esto significa que la cepa K1299 recombina a una frecuencia menor las secuencias homólogas, ya sean cromosómicas o plasmídicas.

En el caso de la GM33, no se registraron eventos de recombinación de secuencias homólogas entre su cromosoma y el de la Hfr (frecuencia <0.001). Este resultado puede interpretarse de dos maneras: Una, que el cromosoma de la KL16 no pudo ser introducido en la cepa GM33 y consecuentemente no pudo recombinar, y dos, que la cepa GM33 no recombine secuencias cromosómicas homólogas con una alta frecuencia.

Marinus y Konrad (1976) reportaron que esta cepa recombina a mayor frecuencia las secuencias homólogas de su cromosoma con las de un plásmido F', pero es posible que no se registre un aumento en la recombinación cromosoma-cromosoma ó plásmido-plásmido. Es decir que los resultados anteriores (incisos 2 y 3) sugieren que la cepa GM33 Dam⁻ no recombina a una alta frecuencia secuencias cromosómicas homólogas y que tampoco recombina las secuencias plasmídicas homólogas del pBX404-7. Aunque en los resultados mencionados no fue posible detectar el fenotipo Hiper-rec de la cepa GM33, la cepa K1299 no muta ni recombina más que la K37, por lo que descartamos la posibilidad de que sea Hiper-rec.

C) GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA
EN LAS CEPAS HimA⁺ Y HimA⁻ Y SU
INFLUENCIA EN LA RECOMBINACION
INTRAPLASMIDICA DEL PLASMIDO R1-19

Estos estudios se hicieron para descartar indirectamente la posibilidad de que la topología del plásmido R1-19 dentro de la cepa K1299 HimA⁻ fuera la causa del alto porcentaje de recombinación de las IS₁ observado en el experimento de estabilidad.

Los trabajos de Gellert et al. (1983) indican que en la cepa K1299 HimA⁻ existe una disminución de por lo menos cuatro

veces en la concentración de la subunidad A de la enzima girasa. Esta enzima esta involucrada en el superenrollamiento (SE) del DNA. En esta misma cepa, al analizar el grado de SE del fago lambda durante el ciclo lisogénico, Gellert y sus colaboradores encontraron que después de 15 minutos de incubación, éste es ligeramente menor al de un fago incubado en una cepa silvestre.

De acuerdo a Drlica (1984) y a Kolodner (1980), un DNA más relajado que lo normal puede disminuir la recombinación de algunas secuencias de DNA como fagos, transposones y probablemente de secuencias homólogas intraplasmídicas in vitro, por lo que, un genoma como el que posiblemente tiene la K1299, disminuiría la capacidad de recombinación de las IS₁ del R1-19 in vivo. Como no se hallaron antecedentes de estudios in vivo, se planteó estudiar esa hipótesis, para lo cual primero se comparó indirectamente el grado de SE del DNA en las cepas K37 HimA⁺ y K1299 HimA⁻, a través del análisis del SE de un plásmido introducido en ellas.

Posteriormente se analizó el comportamiento del plásmido R1-19 en la cepa silvestre de E. coli K37 en condiciones normales de crecimiento, con el de la misma cepa en condiciones en que el plásmido se encuentra más relajado, para lo cual se incubó la cepa K37 en medio de cultivo suplementado con novobiocina, un inhibidor de la girasa. El mismo análisis fue realizado con la cepa de S. typhimurium Su695.

1. GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL PLASMIDO
PMS01 EN CELULAS EN DIFERENTES PUNTOS
DE LA CURVA DE CRECIMIENTO
(EN GELES CON 25 µg DE CLOROQUINA/ml).

Con el fin de determinar las condiciones experimentales que permitieran analizar el grado de SE de una cepa, se estudió este parámetro en células en diferentes puntos de la curva de crecimiento, ya que el grado de SE disminuye al pasar las células de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria (Dorman et al., 1988).

El grado de SE se estudió utilizando un plásmido reportero. Para ello se eligió al plásmido pMS01 (Martínez, 1983) de 2.9 Kilobases (Kb). Este plásmido es un buen instrumento debido a que los trabajos en los cuales se ha medido el grado de SE con técnicas similares a la descrita en este trabajo, se han utilizado plásmidos pequeños como éste (Goldstein y Drlica, 1984; Balke y Gralla, 1987; Higgins et al., 1988; Dorman et al., 1988; Liebart et al., 1989). El pMS01 se construyó a partir del pBR322, al que se le deletó el gen tetA que codifica para la resistencia a tetraciclina (Martínez, 1983). Fue necesario utilizar un plásmido sin este gen pues se ha reportado que en el pBR322, se generan dominios con distintos grados de SE. Los dominios se crean cuando una región del plásmido se ancla a una estructura celular. Al parecer esto sucede al traducirse la proteína TetA, pues antes de la terminación de su síntesis se une a la membrana celular. Como en las bacterias la transcripción y

la traducción están acopladas, esto ocasiona el anclaje del plásmido a la membrana (Lodge et al., 1989).

Se utilizó el método de electroforesis en geles de agarosa en presencia de cloroquina, un compuesto que se intercala en el DNA. Este método permite diferenciar las poblaciones de topoisómeros de un plásmido en una célula; es decir, separar las moléculas que tienen un grado diferente de SE. La posterior comparación de la migración de las bandas en un carril con otros carriles del mismo gel, permite conocer el grado relativo de SE del plásmido en diferentes cepas ó condiciones experimentales.

La estrategia que se siguió fue la de introducir el pMS01 en las cepas K1299, K37 y Su695 por medio de la técnica de Transformación bacteriana (Material y Métodos). La cepa K37 se utilizó como testigo HimA*. La Su695 es una cepa de Salmonella typhimurium, en la cual las IS₁ del R1-19 recombinan con una frecuencia muy alta (Watanabe et al., 1982; Gómez y Torres, 1983). Esta cepa se incluyó ya que existe un antecedente que sugiere que la topoisomerasa I de Salmonella actúa con una mayor eficiencia que la topoisomerasa I de E. coli (Sheikh y Margolin, 1989); de ser así, el DNA de S. typhimurium estaría más relajado que el de E. coli, y esto podría observarse al comparar el grado de SE del plásmido pMS01 introducido en ella.

Las cepas se cultivaron y se les extrajo el DNA, el cual se separó por electroforesis en geles de agarosa con 25 μ g de cloroquina/ml como se describe en este trabajo, y se compararon las bandas de topoisómeros.

Una parte importante de esta metodología consistió en controlar las condiciones de crecimiento del cultivo como son: concentración de nutrientes y iones en el medio, temperatura y oxigenación, además de tomar en cuenta la fase de crecimiento celular en la que se extrae el plásmido, ya que varias investigaciones han demostrado que el grado de SE de un plásmido se modifica por las condiciones mencionadas (Goldstein y Drlica, 1984; Balke y Gralla, 1987; Higgins et al., 1988; Dorman et al., 1988)

En la primera prueba, se extrajo el pMS01 de cultivos en fases de crecimiento exponencial ($DO_{500nm} = 0.6$) y fase de crecimiento estacionario ($DO_{500nm} > 1.4$) con un periodo de estrés nutricional (incubación en fase de crecimiento estacionario) de aproximadamente 10 hrs. El proposito de extraer el plásmido en ambas fases fue comprobar si 25 μ g de cloroquina es una concentración adecuada para observar las diferencias de SE previamente reportadas (Balke y Gralla, 1987). Las Figuras 11 y 12 muestran las fotografías de los topoisómeros observados.

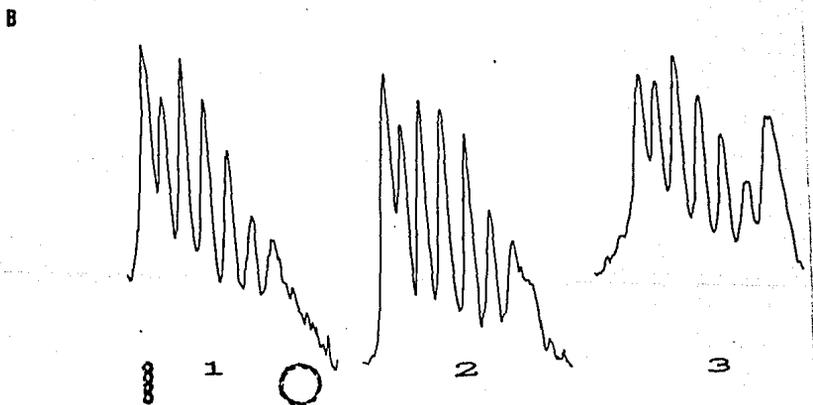
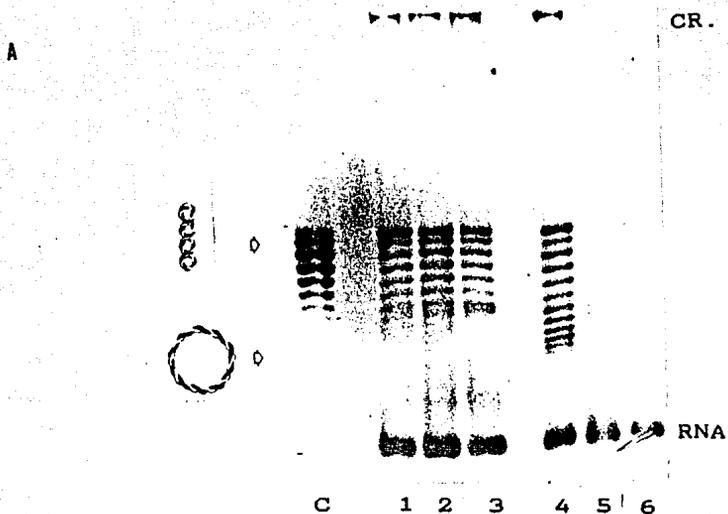


Figura 11. A) Patrón de topoisómeros del plásmido pMS01 obtenido de las cepas K37, K1299 y Su695. Las cepas se crecieron en LB a 37°C y 200 rpm y se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial y estacionario. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con cloroquina [25 µg/ml]. C, pMS01 obtenido de gradiente de CsCl; 1, K37 DO=-.68; 2, K1299 DO=-.65; 3, Su695 DO=-.62; 4, K37 DO=-1.45; 5, K1299 DO=-1.30; 6, Su695 DO=-1.30.

B) Gráficas de barrido densitométrico (DO_{620nm}) del negativo de la fotografía del gel mostrado en (A). Se indica la posición del plásmido relajado y superenrollado. Los números debajo de cada gráfica corresponden a los del gel.

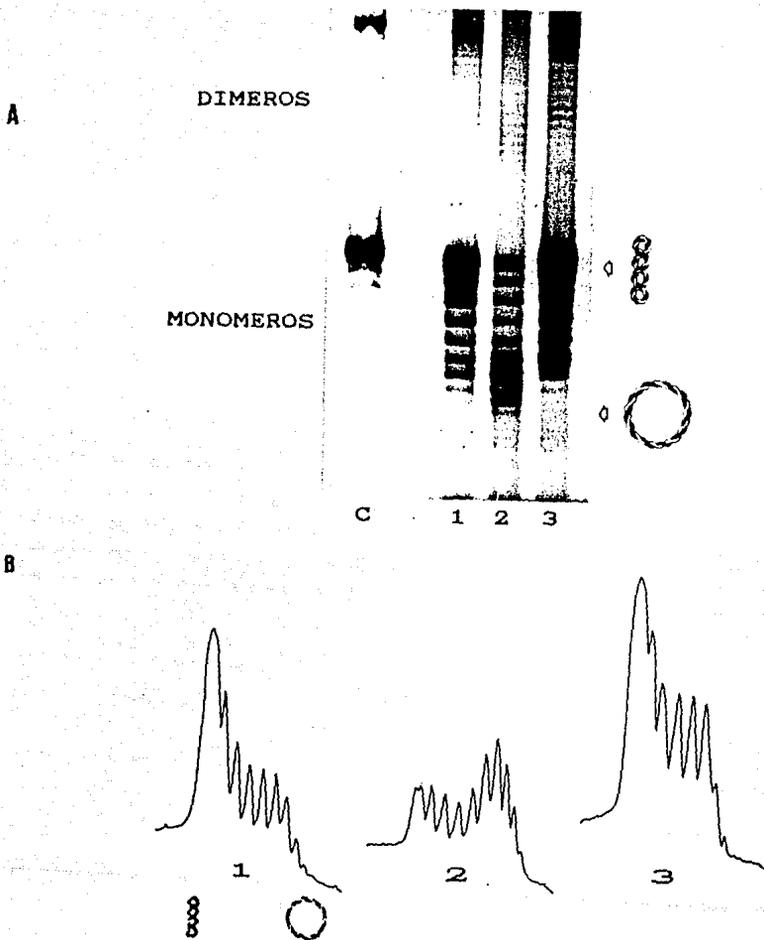


Figura 12. A) Patrón de topoisómeros del plásmido pMS01 obtenido de las cepas K37, K1299 y Su695. Las cepas se crecieron en LB a 37°C y 100 rpm y se cosecharon en la fase de estrés nutricional. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con cloroquina [25 µg/ml]. C, pMS01 obtenido de gradiente de CsCl; 1, K37 DO=1.4; 2, K1299 DO=1.4; 3, Su695 DO=1.4.

B) Gráficas de barrido densitométrico (DO_{420nm}) del negativo de la fotografía del gel mostrado en (A). Se indica la posición del plásmido relajado y superenrollado. Los números debajo de cada gráfica corresponden a los del gel.

En la parte superior de estos geles se observan las bandas correspondientes a la población de plásmido asociado en dímeros (población minoritaria) y en la inferior a los plásmidos en monómeros (población predominante). En ellas se puede ver que los topoisómeros de cada cepa en fase exponencial de crecimiento muestran un patrón de distribución de topoisómeros distinto al de la fase estacionaria: en los carriles correspondientes a la fase estacionaria se pueden observar tres bandas más en la parte inferior del gel, correspondiente a las poblaciones de plásmido más relajado (menor grado de SE). Esto indica que hay una mayor cantidad de plásmido relajado en la fase estacionaria que en la de crecimiento exponencial, en la cual no se pueden observar estos topoisómeros porque su cantidad es muy baja.

En todos los geles hechos con esta técnica se observa que la primer banda de la región de los monómeros, se encuentra a una distancia distinta que la que guardan entre si las demás. El grosor ó intensidad de ella también varia de acuerdo al lote de lisis celular en el que se obtuvo el plásmido. Pensamos que esta banda no es la población de topoisómeros con mayor grado de SE, sino que se trata de una población de plásmidos distinta pues se encuentra más cercana a las otras y en algunos geles su intensidad no varia de uno a otro carril aún cuando los topoisómeros predominantes están varias bandas abajo. La intensidad de estos topoisómeros fue variable, y dependió del lote en el cual se extrajera el plásmido. Pensamos que por retrasarse en la electroforesis, puede tratarse de plásmido roto (Fig. 13) , que puede estar totalmente relajado (con cortes de

una sola cadena) ó plásmido lineal (con cortes de doble cadena). Debido a que puede variar con cada extracción, decidimos no tomar en cuenta la primera banda al analizar los topoisómeros del pMS01.

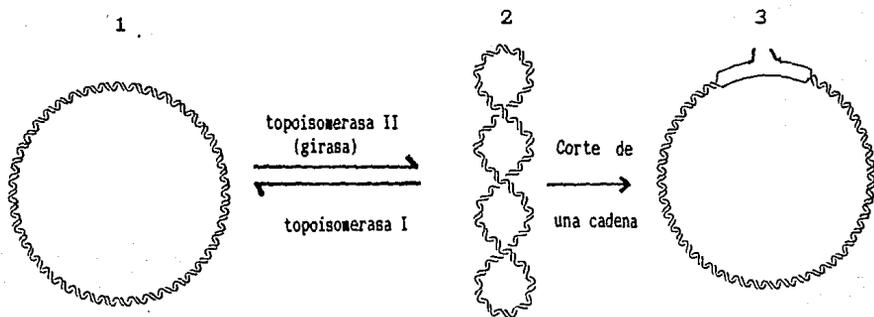


Figura 13. Esquema de un plásmido relajado (1), superenrollado negativamente (2) y relajado por medio de un corte en una cadena del DNA (3).

Con el fin de poder apreciar las bandas de los carriles con poco DNA (Fig. 11, carriles 5 y 6), se hizo un experimento tipo Southern en el cual el DNA del gel se transfirió a papel y se hibridizó con DNA radioactivo del propio plásmido (Material y Métodos). En la Figura 14 se muestra la autorradiografía obtenida. En ella se aprecia que no se incrementó la definición de las poblaciones predominantes de plásmidos marcados en el carril 6, con respecto a los plásmidos observados sin marca radioactiva, por lo que esta técnica no se volvió a aplicar.

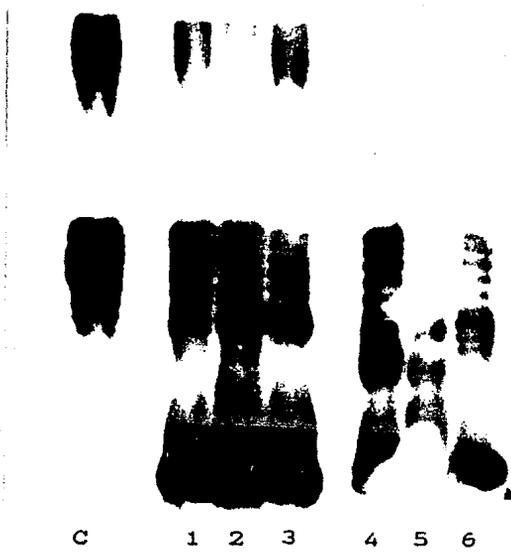


Figura 14. Autorradiografía de la hibridización tipo Southern del gel de la Fig. 11. C, pMS01 obtenido de gradiente de CsCl; 1, K37 DO=.68; 2, K1299 DO=.65; 3, Su695 DO=.62; 4, K37 DO=1.45; 5, K1299 DO=1.30; 6, Su695 DO=1.30.

Para determinar el grado de SE relativo de un plásmido, se compara qué lugar ocupa la banda de mayor intensidad (banda predominante) en cada cepa, y esto nos indica en cuál de ellas es mayor el grado de SE (Liebart *et al.*, 1989). Una manera de detectar cuantitativamente las diferencias entre las bandas es el análisis de las bandas por medio de un espectrofotómetro acoplado a un graficador (Goldstein y Drlica, 1984; Liebart *et al.*, 1989). Este análisis se hizo con el negativo de una fotografía del gel. Las gráficas obtenidas de cada gel se muestran debajo de su fotografía. Las gráficas de la Fig. 11 nos muestran que la tercera banda es la que predomina en las tres cepas, lo cual nos indicó que el grado de SE del plásmido pMS01 en ellas es muy parecido en esta fase de crecimiento.

Posteriormente se realizaron pruebas de los topoisómeros del plásmido bacteriano, en cultivos en distintas fases de crecimiento. Las pruebas incluyeron las siguientes DO_{550nm} : 0.6, 0.85 y 1.0 (fases de crecimiento exponencial); 1.3 (fase estacionaria temprana); 1.5 y 1.6 (fases estacionarias con estrés nutricional). Los patrones de topoisómeros obtenidos pueden verse en las Figuras 12, 15 y 16.

En ellos se observa que con esta concentración de cloroquina, el grado de SE del pMS01 no varía en la cepa K1299 con respecto a la cepa silvestre K37 en las fases crecimiento desde una DO_{550nm} = 0.6 hasta 1.3, fases en las que las bacterias no se encuentran sometidas a condiciones de estrés nutricional.

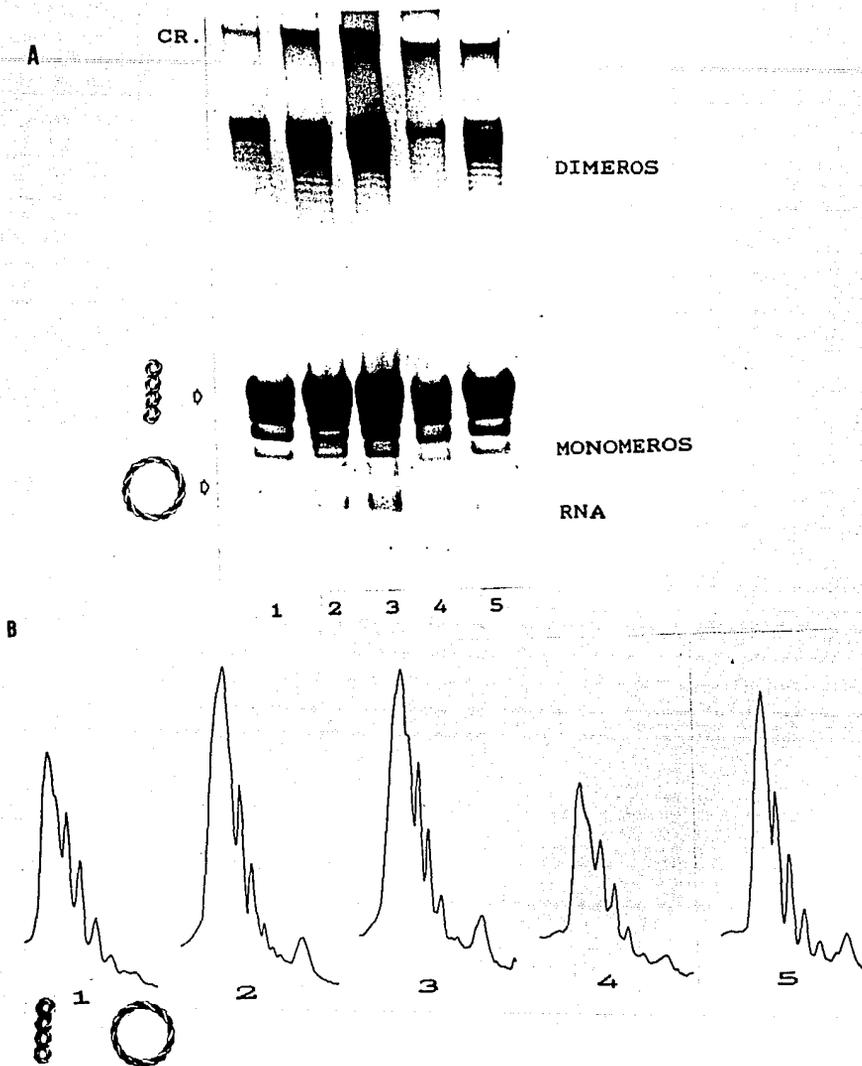
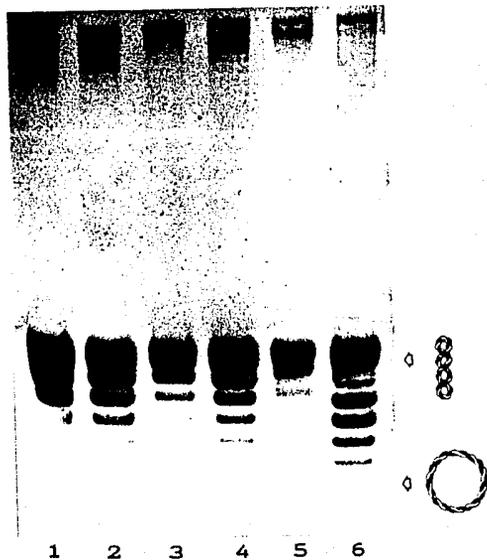


Figura 15. A) Patrón de topoisómeros del plásmido pMS01 obtenido de las cepas K37, K1299 y Su695. Las cepas se crecieron en LB a 37°C y 200 rpm y se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial tardía. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con cloroquina [25 µg/ml]. 1, K37 DO=1.0; 2, K1299 DO=1.0; 3, Su695 DO=1.0; 4, K37 DO=1.0; 5, K1299 DO=1.0. Los cultivos de los carriles 4 y 5 se incubaron 30 min en frío antes de hacer la extracción del plásmido.

B) Gráficas de barrido densitométrico (DO_{420nm}) del negativo de la fotografía del gel mostrado en (A). Se indica la posición del plásmido relajado y superenrollado. Los números debajo de cada gráfica corresponden a los del gel.

A



B

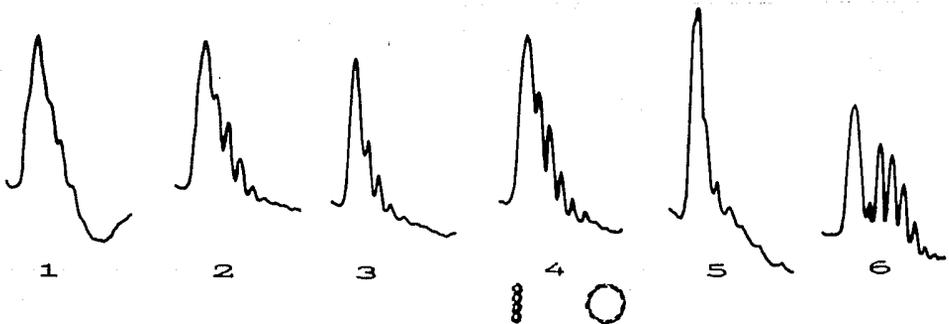


Figura 16. A) Patrón de topoisómeros del plásmido pMS01 obtenido de las cepas K37 y K1299. Las cepas se crecieron en LB a 37°C y 200 rpm y se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial, exponencial tardío y en estrés nutricional. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con cloroquina [25 µg/ml]. 1, K37 DO=0.60; 2, K1299 DO=0.60; 3, K37 DO=1.0; 4, K1299 DO=1.0; 5, K37 DO=1.6; 6, Su695 DO=1.6.

B) Gráficas de barrido densitométrico (DO_{220nm}) del negativo de la fotografía del gel mostrado en (A). Se indica la posición del plásmido relajado y superenrollado. Los números debajo de cada gráfica corresponden a los del gel.

En lo que se refiere a la fase de estrés nutricional, se puede apreciar que en la cepa silvestre K37, hay un desplazamiento en las poblaciones de topoisómeros, lo que indica un menor grado de SE con respecto a la fase de crecimiento exponencial. El relajamiento del DNA en células con condiciones de estrés nutricional ha sido reportado anteriormente (Balke y Gralla, 1987; Dorman et al., 1988).

Al comparar los topoisómeros de la cepa silvestre K37 con los de la K1299 Hima⁻, podemos ver que en condiciones de estrés nutricional el plásmido experimenta un relajamiento significativo en la cepa K1299. Esto podría deberse a que la cepa K1299 contiene cuatro veces menos girasa que una cepa silvestre, lo cual implica tener un DNA más relajado. Sin embargo con la técnica anteriormente descrita no pudimos observar diferencias en el grado de SE entre ambas cepas en la fase de crecimiento exponencial. Es decir que con 25 µg de cloroquina sólo pudimos observar diferencias del SE de ambas cepas en la fase de estrés nutricional. En lo que respecta a la cepa Su695 de S. typhimurium no se pudo observar diferencia en el grado de SE con respecto a la K37 en ninguna de las fases de crecimiento analizadas. Este resultado posiblemente se debió a que con esta concentración de cloroquina únicamente se pueden observar diferencias muy grandes en el grado de SE del DNA. Es posible que al estar muy relajado el DNA (fase de estrés nutricional) se incremente la diferencia en el SE de estas cepas y sólo así se pueda observar.

2. GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL PLASMIDO
pMS01 EN CELULAS CULTIVADAS EN PRESENCIA
Y EN AUSENCIA DE NOVOBIOCINA
(EN GELES CON 25 µg DE CLOROQUINA/ml).

Para determinar si al disminuir el grado de SE del plásmido R1-19 se incrementa la frecuencia de recombinación de las IS₁, se determinó la concentración de novobiocina necesaria para que un plásmido en la cepa K37 presente un grado de SE similar al que presenta en la K1299. Si el incremento de recombinación de las IS₁ observado en la cepa K1299 se debe a que el DNA está más relajado en esta cepa, este incremento podría observarse en la cepa K37 cultivada en presencia de novobiocina.

La novobiocina es un compuesto que entra a la célula y se une a la subunidad B de la enzima girasa e interfiere con las reacciones ATP-dependientes de la enzima. De esta manera disminuye su actividad y por lo tanto disminuye el grado de SE del DNA.

Con el fin de conocer la concentración de novobiocina necesaria para igualar el grado de SE de la cepa K37 con la K1299, se realizaron cultivos de las cepas K37/pMS01, K1299/pMS01 y Su695/pMS01 en LB sin novobiocina y con 40 y 80 µg de novobiocina / ml y se les extrajeron y visualizaron los topoisómeros del pMS01 como se describió anteriormente en un gel de agarosa con 25µg de cloroquina/ml (Fig. 17).

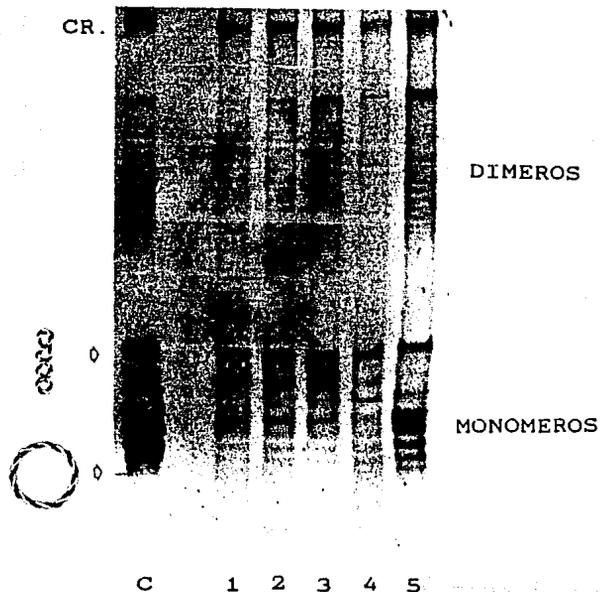


Figura 17. A) Patrón de topoisómeros del plásmido pMS01 obtenido de las cepas K37 con y sin novobiocina, K1299 y Su695. Las cepas se crecieron en LB a 37°C y 200 rpm y se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial (DO=0.80). Los topoisómeros se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con cloroquina [25 µg/ml]. 1, K37 sin Nov; 2, K37 con Nov [40 µg/ml]; 3, K37 con Nov [80 µg/ml]; 4, K1299 sin Nov; 5, Su695 sin Nov.

El análisis de este gel no reveló diferencias en el grado de SE de la K37 cultivada sin y con novobiocina, ni tampoco con respecto a la cepa K1299. Debido a ello, el único indicador que teníamos para medir la dosis adecuada de novobiocina era el retraso en la curva de crecimiento en las células tratadas con este compuesto (Fig. 18).

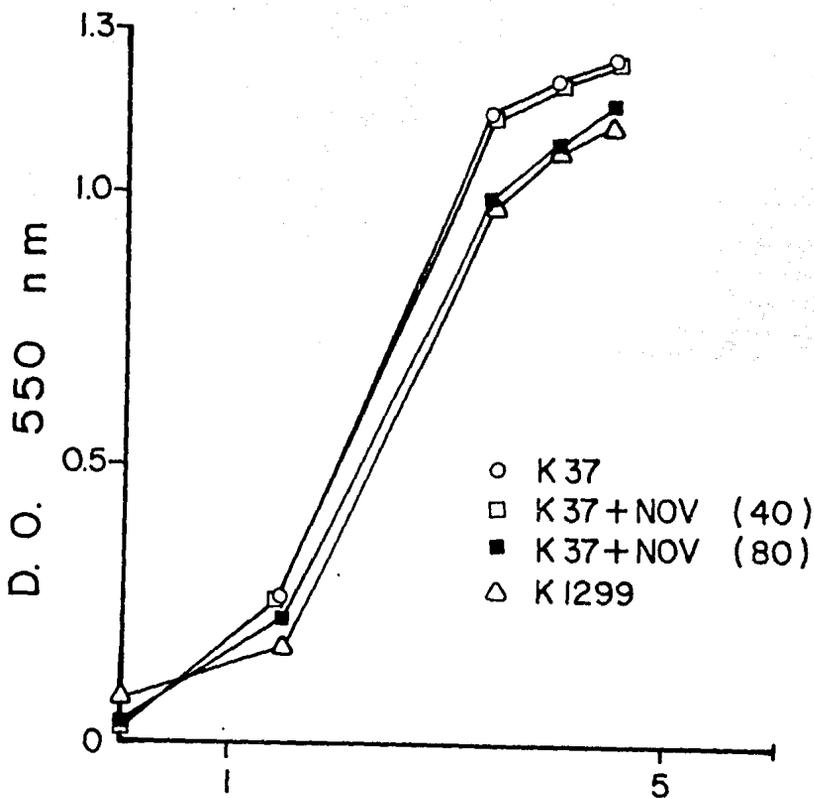


Figura 18. Curvas de crecimiento de las cepas K37 cultivada sin y con novobiocina (Nov) [40] y [80 $\mu\text{g}/\text{ml}$], y K1299. El cultivo se realizó a 37°C y 200 rpm de agitación.

La cepa K1299 cultivada en LB, manifiesta un crecimiento más lento que la cepa K37 (Fig. 19). Pensamos que ello se debe a la disminución del grado de SE por tener menos girasa, como lo vimos anteriormente. De acuerdo con este razonamiento, la concentración de novobiocina que iguale la velocidad de crecimiento de la K37 con la de la K1299, posiblemente también iguale el grado de SE de ambas cepas. Por ello, cultivamos la cepa K37 en presencia de 40 y 80 μg de novobiocina/ml de LB y se comparó su curva de crecimiento con la de la cepa K1299 en cultivos realizados a 200 rpm de agitación (Fig. 18). Con una concentración de 80 μg de novobiocina/ml se obtuvo una curva de crecimiento similar a la de la K1299. Esta concentración de novobiocina es la que se utilizó para realizar las pruebas de estabilidad del R1-19 en cepas con novobiocina.

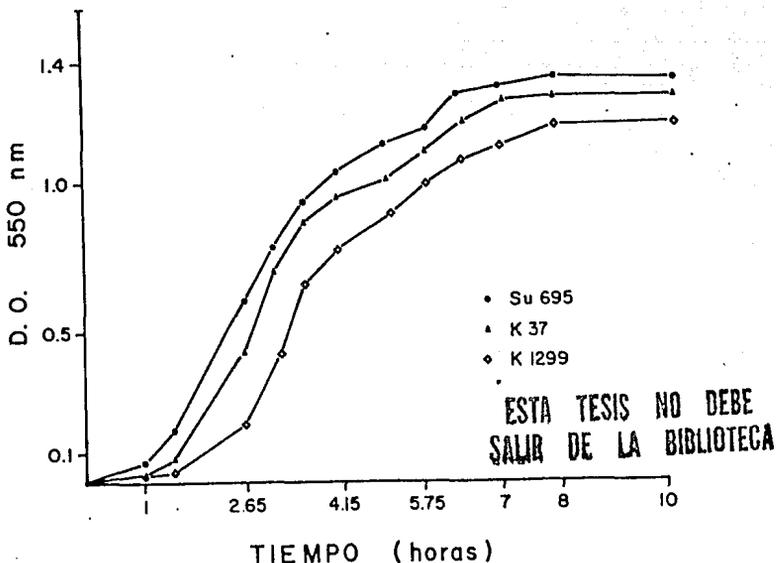


Figura 19. Curvas de crecimiento en medio LB, de las cepas K37, K1299 y Su695. Los cultivos se incubaron a 37°C y 150 rps.

3. DISOCIACION DEL PLASMIDO FII R1-19 EN
E. coli Y EN S. typhimurium CULTIVADAS
EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE NOVOBIOCINA.

Esta serie de pruebas se hicieron con el fin de observar el comportamiento del plásmido R1-19 en bacterias con un DNA más relajado que el normal en cepas silvestres. El objetivo fue descartar la posibilidad de que el comportamiento de alta recombinación de las IS₁ del R1-19 en la cepa K1299 IHF⁻ fuera una consecuencia de un DNA más relajado que el de las cepas IHF⁺. Para ello utilizamos la cepa K37/R1-19 a la cual cultivamos en medio LB con novobiocina [80 µg/ml]. Como explicamos anteriormente, la novobiocina es un compuesto que inhibe la acción de la girasa, y hace que el DNA disminuya su grado de SE. Con los geles de 25 µg de cloroquina / ml no se pudo observar diferencias en el grado de SE de ambas cepas con y sin novobiocina, pero con una concentración de 80 µg de novobiocina/ml en el cultivo se igualó la curva de crecimiento de la K37 con la de la K1299 (Fig. 18). Debido a ello se utilizó esta concentración de novobiocina para realizar una prueba de estabilidad del plásmido R1-19 en la cepa K37. Como control se cultivó la misma cepa en medio LB sin novobiocina. Los cultivos se realizaron con 50 ml de LB a 37°C con una agitación constante de 100 rpm. Los resultados se pueden observar en la Tabla VI. En ellos se puede ver que en el cultivo con novobiocina [80 µg/ml], la frecuencia de aparición de células multisensibles (recombinación entre IS_{1a}-IS_{1b}) es significativamente menor al del cultivo sin novobiocina.

TABLA VI. FRECUENCIA DE LOS PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS DERIVADAS DEL EXPERIMENTO DE ESTABILIDAD DEL PLASMIDO FII, R1-19 EN Escherichia coli CON 80 µg DE NOVIOBIOCINA/ml.*

PATRON DE RESISTENCIA	K37/R1-19 sin Novobiocina		K37/R1-19 Novobiocina [80µg/ml]	
	A	B	A	B
	Multirresistente	90	81	100
Multisensible	10	16	0	1
AP ^r Sp ^r Cm ^r	0	1	0	1
Km ^r	0	0	0	0
Otros	0	2	0	0

*Los números representan valores en por ciento. Las columnas A y B muestran los porcentajes obtenidos en dos experimentos diferentes, después de aproximadamente 265 generaciones. Los cultivos se realizaron con 50 ml de LB a 100 rpm de agitación.

La K37 es una cepa de E. coli en la que la frecuencia de recombinación es por lo general muy baja (ver Tabla II), por lo cual se tuvo que cultivar durante un número muy alto de generaciones para poder observar la frecuencia de la Tabla VI. Sin embargo la cepa K37 con novobiocina aún al ser cultivada por un largo número de generaciones manifestó una frecuencia aún menor que la K37 sin tratamiento.

Posteriormente se realizó una prueba de estabilidad del R1-19 en una cepa de S. typhimurium cultivada en presencia de 40 y 80 µg de novobiocina / ml de LB; los cultivos se realizaron con 20 ml de LB a 37°C con una agitación constante de 200 rpm. Los patrones de resistencia obtenidos se muestran en la Tabla VII.

TABLA VII. FRECUENCIA DE LOS PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS DERIVADAS DEL EXPERIMENTO DE ESTABILIDAD DEL PLASHIDO FII, R1-19 EN Salmonella typhimurium CON NOVIOBIOCINA.*

PATRON DE RESISTENCIA	Su695/R1-19 sin Novobiocina	Su695/R1-19 Novobiocina[40µg/ml]	Su695/R1-19 Novobiocina[80µg/ml]
Multirresistente	4	0	0
Multisensible	82	87	95
Ap ^r Sp ^r Cm ^r	8	13	3
Km ^r	0	0	0
Otros	6	0	2

*Los números representan valores en por ciento. La prueba del patrón de resistencia se realizó después de aproximadamente 26 generaciones. Los cultivos se realizaron con 20 ml de LB a 200 rpm de agitación.

En ellos se observa que la frecuencia de células multisensibles aumentó en relación directa a la concentración de novobiocina utilizada. Podemos ver que en la bacteria S. typhimurium Su695 ocurrió un fenómeno contrario al observado en la cepa K37 de E. coli. Este resultado sugiere que la novobiocina actúa de una manera distinta en ambas bacterias por lo cual era necesario estudiar de una manera más precisa cómo afectaba el SE del DNA en cada una. Esto nos condujo a desarrollar una técnica más precisa para medir el grado de SE en cada cepa.

4. GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL PLASMIDO
pMS01 EN CELULAS EN DIFERENTES PUNTOS
DE LA CURVA DE CRECIMIENTO
(EN GELES CON 9 μ g DE CLOROQUINA/ml).

Posteriormente al periodo de pruebas de estabilidad del R1-19 en cepas tratadas con novobiocina, se utilizó una concentración menor de cloroquina en los geles, con el fin de obtener una mejor resolución de las bandas de topoisómeros y medir el grado de SE del pMS01 de una manera más precisa.

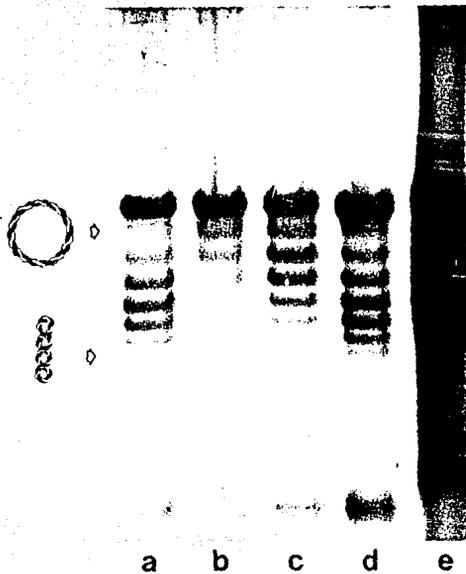
Decidimos disminuir la concentración de cloroquina con el fin de modificar la migración de los topoisómeros del pMS01, y poder observar la diferencia en el SE del DNA de la cepa K37 con respecto a la K1299 en la fase de crecimiento exponencial. Primero se bajó la concentración a 20 μ g de cloroquina, sin obtenerse una mejor separación de topoisómeros, es decir que tampoco observamos diferencias en el SE del pMS01 entre ambas cepas.

Debido a ello se decidió utilizar concentraciones menores de 12 μ g, con las cuales la migración de los topoisómeros se invierte; es decir, que ahora los plásmidos más superenrollados migran con una mayor velocidad que los relajados (Balke y Gralla, 1987; Liebart et al., 1989). Con esta concentración de cloroquina, la banda de los plásmidos rotos se localiza en una posición en la que no interfiere con la de los topoisómeros como

cuando se utilizó [25 µg/ml] (Fig. 15, carriles 2,4 y 6) para obtener así una mayor resolución al medir el grado de SE de las cepas K1299, K37 y Su695 en la fase de crecimiento exponencial.

Para ello se probaron varias concentraciones de cloroquina. Con 5 µg de cloroquina / ml no se logró una buena separación de los topoisómeros. Con 10 µg de cloroquina la separación de los topoisómeros fue similar a la de 25 µg de cloroquina, pero con la ventaja de que la primera banda no interfiere con las bandas principales. La mejor separación de topoisómeros se obtuvo con 9 µg de cloroquina y 20 horas de electroforesis a 30 volts.

En las Figuras 20, 21 y 22 se observan los patrones obtenidos con esta técnica. Un análisis de los mismos muestra que en la fase de crecimiento exponencial el plásmido pMS01 se encuentra entre 1 y 2 vueltas más relajado en la cepa K1299 que en la K37, debido probablemente a que tiene menos girasa que la K37, como ya se mencionó (Fig. 21 y 22). Esta diferencia se conserva al avanzar en la curva de crecimiento. Es importante destacar que esta diferencia en la distribución de los topoisómeros no era visible con los geles de 25 ó 20 µg de cloroquina por ml, probablemente por la interferencia de los topoisómeros del plásmido roto.



a b c d e

B

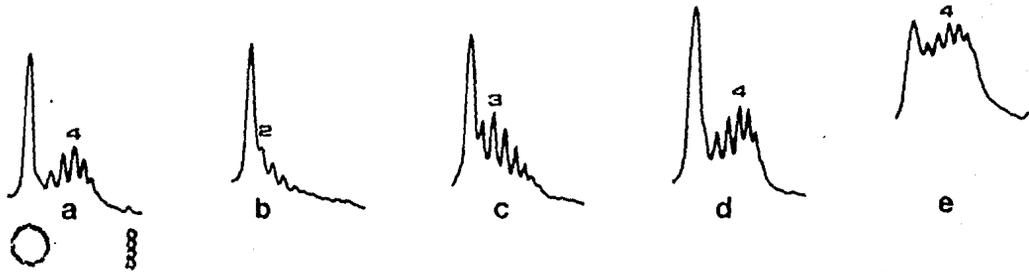
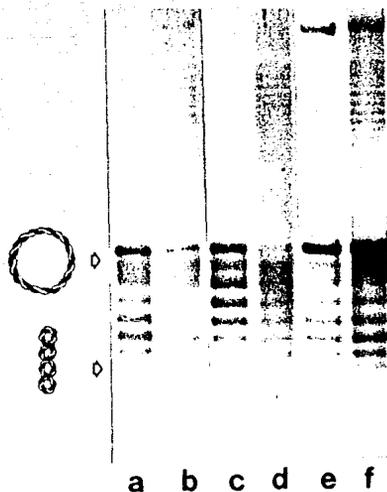


Figura 20. A) Patrón de topoisómeros del plásmido pMS01 obtenido de las cepas K37 con y sin novobiocina, K1299 y Su695 sin y con novobiocina. Las cepas se crecieron en LB a 37°C y 200 rpm y se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial tardía. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con cloroquina [10 µg/ml]. a, K37 sin Nov DO=0.97; b, K37 con Nov [80 µg/ml] DO=0.90; c, K1299 sin Nov DO=0.85; d, Su695 sin Nov DO=1.09; e, Su695 con Nov [80 µg/ml] DO=1.0.

B) Gráficas de barrido densitométrico (DO_{420nm}) del negativo de la fotografía del gel mostrado en (A). Se indica la posición del plásmido relajado y superenrollado. Las letras debajo de cada gráfica corresponden a las del gel. El número sobre la curva indica la posición del pico predominante.

A



B

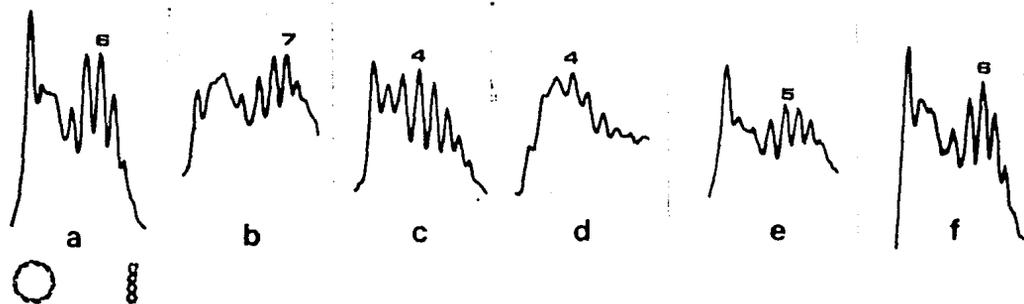


Figura 21. A) Patrón de topoisómeros del plásmido pMS01 obtenido de las cepas K37, K1299 y Su695. Las cepas se crecieron en LB a 37°C y 100 rpm y se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial y fase de estrés nutricional. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con cloroquina (9 µg/ml). a, K37 DO=.75; b, K37 DO=.85; c, K1299 DO=.62; d, K1299 DO=.88; e, Su695 DO=.54; f, Su695 DO=1.03.

B) Gráficas de barrido densitométrico (DO_{220nm}) del negativo de la fotografía del gel mostrado en (A). Se indica la posición del plásmido relajado y superenrollado. Las letras debajo de cada gráfica corresponden a las del gel. El número sobre la curva indica la posición del pico predominante.

A



B

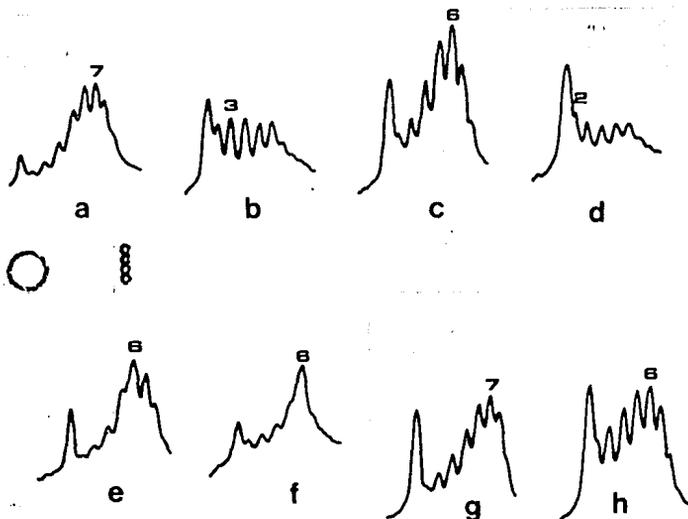


Figura 22. A) Patrón de topoisómeros del plásmido pMS01 obtenido de las cepas K37, K1299 y Su695 sin y con novobiocina (80 $\mu\text{g/ml}$). Las cepas se crecieron en LB a 37°C y 100 rpm y se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con cloroquina (9 $\mu\text{g/ml}$). a, K37 sin Nov DO=.62; b, K37 con Nov DO=.66; c, K1299 sin Nov DO=.56; d, K1299 con Nov DO=.54; e, Su695 sin Nov DO=.43; f, Su695 con Nov DO=.40; g, K37 sin Nov DO=.80; h, K1299 sin Nov DO=.70.

B) Gráficas de barrido densitométrico (DO_{260nm}) del negativo de la fotografía del gel mostrado en (A). Se indica la posición del plásmido relajado y superenrollado. Las letras debajo de cada gráfica corresponden a las del gel. El número sobre la curva indica la posición del pico predominante.

Con respecto a la cepa de S. typhimurium Su695, podemos observar que en los geles en que se analizaron los topoisómeros del pMS01, éste manifestó un grado de SE ligeramente mayor al de la cepa K1299, y menor al de la K37. En el gel de la Figura 21 los topoisómeros predominantes de la cepa Su695 se encuentran en un lugar intermedio al de las cepas K1299 y K37. En el gel de la Figura 22 se encuentran en el mismo lugar que los de la K1299, pero aún aquí se observa que el pMS01 está más relajado que en la K37. Esto indica que en esta cepa de Salmonella el pMS01 tiene un grado de SE ligeramente menor al de la cepa de E. coli K37, aunque similar al de la cepa K1299. Esto podría tomarse como una evidencia indirecta que apoya que la topoisomerasa I de S. typhimurium es más eficiente que la de E. coli; sin embargo, para ello se necesitaría hacer un análisis más fino.

5. GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO DEL PLASMIDO
pMS01 EN CELULAS CULTIVADAS EN PRESENCIA
Y EN AUSENCIA DE NOVIOBIOCINA
(EN GELES CON 9 µg DE CLOROQUINA/ml).

Como se puede ver en las Figuras 20 y 22, se analizó el grado de SE del pMS01 en cepas tratadas con novobiocina [80µg/ml]. La Fig. 20 muestra el patrón de los topoisómeros de cultivos realizados con 20 ml de LB con una agitación constante de 200 rpm en una fase de crecimiento estacionaria temprana (ver Fig. 18). En estas condiciones la cepa K37 tratada con novobiocina experimentó un relajamiento mayor al de la K1299. En

cambio en la cepa Su695 tratada con novobiocina no se observa diferencia con el patrón de topoisómeros de la cepa crecida sin novobiocina.

Los resultados anteriores podían estar afectados por la forma en que se realizó el cultivo para la extracción del pMS01 (20 ml de LB con 200 rpm de agitación), por lo cual se hicieron pruebas de la acción de novobiocina en condiciones de crecimiento idénticas a las utilizadas en los experimentos de estabilidad; es decir, 50 ml de cultivo a 100 rpm. La Figura 22 muestra el patrón de topoisómeros obtenido con estas condiciones de cultivo, en la fase de crecimiento exponencial. Con estas condiciones se obtuvo un resultado aún más significativo. Como se puede ver con la comparación de los picos predominantes, la cepa K37 tratada con novobiocina manifestó un relajamiento del DNA mucho mayor que el de la K1299 (tres supervueltas más desenrollado). En cuanto a la cepa Su695, aún en estas condiciones de análisis, el pMS01 no manifestó un efecto notable al ser tratada la cepa con 80 μ g de novobiocina / ml.

Esto nos indicó que el grado de SE de la K37 con [80 μ g] de novobiocina es menor que el de la K1299. Es decir que en el experimento de estabilidad del R1-19 con 80 μ g de novobiocina relajamos el DNA de la K37 más de lo que está relajado en la K1299.

Estos dos geles indicaron además que la concentración de novobiocina afecta de una forma distinta dependiendo de la aereación que tenga el cultivo. Por ello se decidió hacer las curvas de crecimiento de cultivos con una agitación de 100 rpm y encontramos que en estas condiciones la curva de la K37 tratada con 80 μg de novobiocina / ml sí se afecta en mayor grado que la K1299 sin tratamiento (Fig. 23).

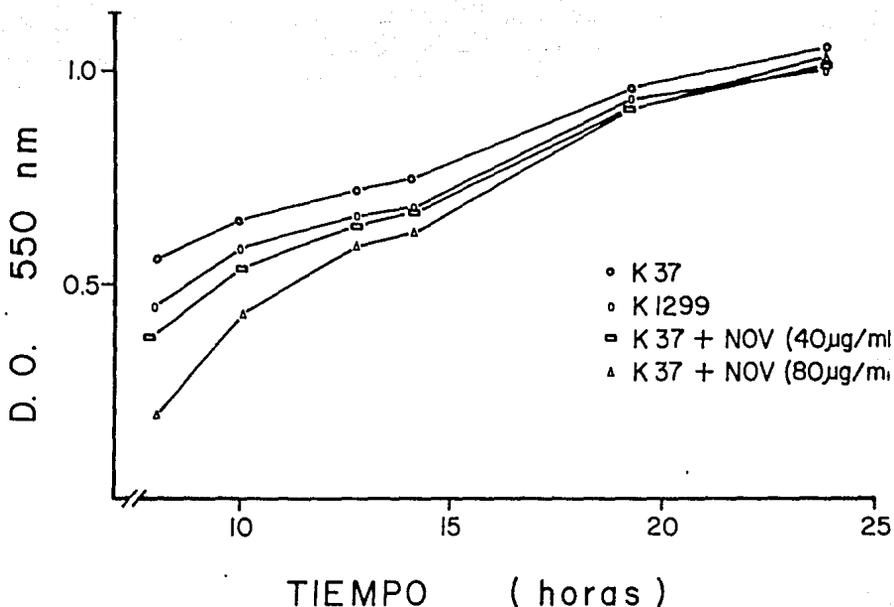


Figura 23. Curvas de crecimiento de las cepas K37 cultivada sin y con novobiocina (Nov) [40] y [80 $\mu\text{g}/\text{ml}$], y K1299. El cultivo se realizó a 37°C y 100 rpm de agitación.

Estos resultados sugieren que la novobiocina afecta más la fisiología celular cuando hay condiciones de menor aereación: Con 200 rpm, la curva de crecimiento de la K37 tratada con novobiocina se iguala a la K1299, pero el DNA se relaja más que el de la K1299. Con 100 rpm de agitación, tanto el crecimiento como el SE de la K37 disminuyen más que los de la K1299.

El grado de SE de la K37 cultivada con novobiocina es menor que el de la K1299 (Fig. 20), pero su curva de crecimiento no se afectó tanto como lo está la de la K1299; es decir que al parecer el grado de SE del DNA de la K1299 no es el único factor que afecta en el crecimiento de la misma, sino que la ausencia de la proteína HimA influye de alguna manera adicional en su fisiología.

6. PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL R1-19 EN Salmonella typhimurium CULTIVADA EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE NOVOBIOCINA

A partir de los resultados anteriores decidimos realizar la prueba de estabilidad del R1-19 en la cepa Su695 en un cultivo realizado con 50 ml de LB a 100 rpm. Los resultados se muestran en la Tabla VIII.

TABLA VIII. FRECUENCIA DE LOS PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS DERIVADAS DEL EXPERIMENTO DE ESTABILIDAD DEL PLASMIDO FII, R1-19 EN Salmonella typhimurium CON 80 µg de NOVIOBIOCINA/ml. *

PATRON DE RESISTENCIA	Su695/R1-19 sin Novobiocina	Su695/R1-19 Novobiocina [80µg/ml]
Multirresistente	75	9
Multisensible	13	88
Ap ^r Sp ^r Cm ^r	8	2
Km ^r	1	0
Otros	3	1

*Los números representan valores en por ciento. La prueba del patrón de resistencia se realizó después de aproximadamente 23 generaciones. Los cultivos se realizaron con 50 ml de LB a 100 rpm de agitación.

En ellos podemos ver que con estas condiciones de cultivo, este tratamiento con novobiocina indujo una frecuencia mayor de recombinación entre las IS_{1a}-IS_{1b} (células multisensibles). Con estas condiciones se disminuyó la aereación del cultivo y como consecuencia de ello se aumentó la frecuencia de recombinación de las IS₁. Sin embargo el patrón de topoisómeros de la Su695 cultivada en diferentes condiciones de aereación y en ausencia y presencia de novobiocina (Fig. 20 y 22) es similar. Esto sugiere que la aereación del cultivo es determinante para la acción que ejerce la novobiocina en el proceso de recombinación de las IS₁ en S. typhimurium, pero no afecta tanto su grado de SE.

V. DISCUSION

En el presente trabajo se estudió la influencia de la proteína HimA en la recombinación de las secuencias de inserción IS₁ del plásmido R1-19. Para ello se propuso un modo de acción directo y uno indirecto. De manera directa, el dímero IHF, formado por el producto de himA y himD/hip, podría unirse a los extremos de las IS₁ y bloquear la acción de las enzimas encargadas de la recombinación de las IS₁. De una manera indirecta, la ausencia de HimA puede modificar el grado de SE del DNA, el cual es un factor determinante para la recombinación en general del DNA, con lo cual también puede disminuirse la recombinación de estas secuencias.

Con el fin de investigar ambas posibilidades, estudiamos la recombinación intraplasmídica mediada por IS₁ en el plásmido FII R1-19, en células de E. coli HimA⁺ y HimA⁻, y de S. typhimurium con diferentes grados de SE del DNA.

En la cepa de E. coli K1299 HimA⁻ se incrementó la recombinación de las IS₁ en comparación con una cepa isogénica silvestre. El grado de SE de su DNA se analizó indirectamente y se encontró que es menor que el de su isogénica silvestre K37;

sin embargo, al disminuir el SE de la K37, disminuyó la recombinación de las IS₁.

En una cepa de S. typhimurium analizada, el grado de SE fue ligeramente menor al de la cepa silvestre de E. coli K37, y ligeramente mayor al de la cepa K1299 HimA⁻. Cuando se disminuyó el SE del DNA de S. typhimurium se incrementó la recombinación de las IS₁. Es decir, que manifestó un efecto contrario al observado en la cepa K37.

En la cepa K1299, la recombinación de las IS₁ del R1-19 manifestó un aumento de 8 a 15 veces la frecuencia de su isogénica silvestre (K37) y de un 27 a un 70% con respecto a una cepa Hiper-rec (GM33), lo cual indica un incremento bastante significativo para una cepa de E. coli.

En las cepas Hiper-rec, el aumento de la recombinación intraplasmídica de las IS₁ ha sido probado con anterioridad (Gómez y Torres, 1983), y aunque su frecuencia es menor que la de S. typhimurium, es varias veces mayor que en las cepas silvestres de E. coli.

La cepa K1299 no manifiesta comportamiento Hiper-rec para secuencias homólogas plasmídicas ó cromosómicas distintas de las IS₁. Por el contrario, manifiesta una disminución en ambas frecuencias en comparación con su isogénica silvestre. Esto sugiere que su incremento en la recombinación de las IS₁ no se debe a un comportamiento Hiper-rec.

El tipo de recombinación del R1-19 que se registró con mayor frecuencia, fue entre las IS₁ más alejadas (IS_{1a}-IS_{1b}). En trabajos previos, en las cepas hiper-recombinantes de *E. coli* GM33/R1-19 (dam-3) y W3111/R1-19 (polA1) así como en *S. typhimurium* el tipo de recombinación más frecuentemente encontrado fué también entre las IS₁ más alejadas (Gómez y Torres, 1983). Una posible explicación a este fenómeno es que estas secuencias se encuentren a una distancia óptima para su acercamiento y recombinación por parte de las enzimas de recombinación (RecA, RecBCD y RecF). Una posibilidad es que la otra IS₁ se encuentre demasiado cercana a las otras dos, y para que pueda recombinar con cualquiera de ellas, necesite modificarse la topología de la molécula. Esto podría implicar la participación de un mayor número de enzimas ó factores, por lo cual serían favorecidos los eventos de recombinación entre las primeras. Otra posible explicación es que la similitud entre las IS_{1a}-IS_{1b} sea mayor entre ellas que con la IS_{1c}, y por ello tengan una mayor facilidad para recombinar. Esto se apoya en el hecho de que no todas las IS₁ son idénticas, sino que forman parte de una familia de isosecuencias (Bustos, 1986).

Con el fin de explicar las diferencias de recombinación de las IS₁ del R1-19, observadas entre las cepas K37, K1299 y Su695, proponemos cuatro explicaciones alternativas.

1. El IHF de *E. coli* al unirse a los extremos de las IS₁, puede interferir en la acción de las enzimas de recombinación general sobre estas secuencias. Al no estar presente este factor,

las IS₁ pueden recombinar libremente. La interferencia por parte del IHF podría ser directa, al bloquear los sitios de reconocimiento del DNA a las enzimas, ó indirecta, al modificar la topología del DNA necesaria para la acción de estas enzimas.

Las enzimas de recombinación de *E. coli* podrían actuar con más eficiencia sobre las IS₁ cuando está ausente el IHF: sabemos que las enzimas de recombinación requieren de cierta topología del DNA para poder actuar eficientemente (Drlica, 1984) y como hemos visto, la unión del IHF al DNA puede modificar su topología (Pettijohn, 1988; Friedman, 1988). Es decir, que en la K1299 la eficiencia de estas enzimas sobre las IS₁ podría ser distinta: mayor en las cepas IHF⁻ debido a una mejor conformación del sustrato (IS₁) y que en las cepas silvestres no haya una buena interacción enzima-IS₁. Sin embargo, esto no parece muy probable, porque en las cepas *himA*⁻ el DNA se encuentra con un grado de SE menor al de las silvestres debido a la falta del IHF, que por si mismo puede hacer que el DNA tenga un mayor grado de SE, además de que la concentración de Gyra está disminuida. Kolodner (1980) reportó que en un sistema *in vitro* cuando se relaja el DNA, disminuye la recombinación de algunas secuencias plasmídicas. En el presente trabajo, al disminuir el SE de la K37 *in vivo*, la frecuencia de recombinación de las IS₁ también disminuyó.

Aunque el papel del IHF podría ser alterar la expresión de algún gen, cuyo producto modifique la eficiencia de las enzimas

de recombinación sobre las IS₁, otra opción sería que el IHF simplemente bloqueé las IS₁.

Para explicar la alta frecuencia de recombinación de *S. typhimurium*, tenemos que recurrir a la acción del producto de un gen distinto en esta bacteria, mucho más eficiente para recombinar las IS₁, que las enzimas de *E. coli*. Este gen además tiene que funcionar mejor con un genoma más relajado, como lo observamos en el presente trabajo.

2. Puede existir un sistema de recombinación específico para las IS₁, en ambas bacterias, pero que actúe de manera distinta en ambas bacterias. Este sistema puede tener distinta eficiencia en cada bacteria. Es decir, que para la recombinación de las IS₁ las enzimas tienen una mejor actividad, posiblemente por la acción de algún gen adicional, ó porque actúa alguna enzima, distinta a las que recombinan las secuencias homólogas generales. Una posibilidad es que sobre las IS₁ actúe el producto de dor (RecA-dependiente), y aunque este gen solamente ha sido descrito en *S. typhimurium*, puede existir también en *E. coli*.

Si dor existiera en ambas bacterias, el efecto de este gen podría estar modulado por el SE del DNA y por el IHF. Ambos factores podrían interactuar de alguna manera, para producir los efectos observados. Existen las posibilidades de que el IHF a) funcione igual ó, b) funcione diferente en ambas bacterias.

a) Si el IHF funciona igual en ambas bacterias, en S. typhimurium el IHF y su grado de SE pueden ser las condiciones necesarias para el funcionamiento de dor en la recombinación de las IS₁, y con la novobiocina en combinación con el IHF se alcanzaría el mejor grado de SE para incrementar la recombinación intraplasmídica. En la cepa K1299 el grado de SE es muy similar al de S. typhimurium, pero no posee IHF, por lo cual la recombinación no aumenta tanto.

La cepa K37 cultivada sin novobiocina, estaría por fuera de los límites del SE adecuado, y en la K37 cultivada con novobiocina, el DNA se relajaría más que el de la K1299 y el de la Su695, y se saldría totalmente del rango en el que puede haber recombinación de las IS₁.

b) Si el IHF de ambas bacterias no funciona igual, en E. coli la acción del gen dor podría estar bloqueada por una mala interacción del IHF con su DNA. Es posible que en E. coli el producto de este gen actúe únicamente sobre las IS₁ libres de IHF. En S. typhimurium, el gen h_{im}A (subunidad α del IHF) tiene una secuencia distinta en tres aminoácidos al de E. coli y la unión IHF-IS₁ se ha probado únicamente con el IHF y las IS₁ de E. coli. Es decir, que probablemente se encuentre alterado el dominio de unión del IHF en S. typhimurium, ya que se trata de una unión sitio-específica. El gen de la subunidad β del IHF de S. typhimurium aún no se ha secuenciado, pero podría tener también diferencias con respecto a la de E. coli. Esto apoyaría la hipótesis de un comportamiento diferente de este factor entre

ambas bacterias, y si así fuera, la acción de dor también puede ser distinta entre ellas.

La diferencia entre la cepa K1299 y la K37 se podría explicar a través de una mayor expresión del gen dor en la K1299 por el hecho de no tener IHF, pues se ha demostrado que este factor puede disminuir la expresión de algunos genes (Friedmann, 1988). Sin embargo, no podríamos explicar un gran incremento en la expresión de dor en S. typhimurium.

Posiblemente la unión IS₁-IHF de S. typhimurium tenga algún efecto en la topología del DNA, provocando que se incremente el grado de SE de esta cepa (Gellert et al., 1983; Drlica y Rouviere-Yaniv, 1987), con lo cual la acción de dor podría ser mejor que en E. coli. El efecto de disminuir el SE podría favorecer a dor, como lo observamos en este trabajo.

3. Posiblemente exista una resolvasa para la disociación del R1-19, pero que actúa con muy baja eficiencia, en comparación con el sistema de recombinación de S. typhimurium. La actividad de esta resolvasa sería disminuida por la acción del IHF de E. coli.

No se ha podido detectar actividad de resolvasa en E. coli, pero esto puede deberse a una interferencia del IHF en las cepas analizadas, el cual puede provocar un cambio conformacional del DNA y que podría alterar la acción de esta enzima (Gellert et

al., 1983; Drlica y Rouviere-Yaniv, 1987) ó tal vez el IHF disminuya la expresión del gen de la resolvasa, como lo hace con otros genes (Friedmann, 1984). Si el IHF se comporta de manera similar en ambas bacterias, la falta de actividad de resolvasa en S. typhimurium recA⁻ puede deberse también a una interferencia del IHF.

Sin embargo, en la cepa IHF⁻ de E. coli no se detectó una actividad de resolvasa con una frecuencia comparable a la que puede observarse por recombinación en S. typhimurium. Es decir, que la recombinación del R1-19 podría plantearse de la siguiente manera: como una recombinación entre las IS₁ cuando existen las condiciones necesarias para las enzimas de recombinación (como en el caso de S. typhimurium), y cuando esas condiciones no son las adecuadas, entra en juego la resolvasa, recombinando de forma sitio-específica las IS₁ del cointegrado con una menor frecuencia, pero que para funcionar, necesite estar ausente el IHF.

El problema con esta alternativa, es que no podemos explicar el aumento en la frecuencia de disociación del R1-19 en S. typhimurium al cultivarse con novobiocina y su disminución en E. coli cultivada con novobiocina.

4. Puede existir un represor de la recombinación del R1-19 (Chernin y Ovadis, 1980), el cual actúa de manera diferente en ambas bacterias. La diferencia estaría en un IHF que actúe de

forma distinta. El represor del plásmido R1-19 podría necesitar de cierta conformación del DNA para reprimir, efectivamente la recombinación de las IS₁, la cual sería estimulada por el IHF de E. coli; el IHF de S. typhimurium no sería favorable para el represor y en este caso, la novobiocina modificaría la topología del DNA y disminuiría más aún la acción de este represor. Pero no podemos explicar porqué la novobiocina no modificó la acción del represor en la cepa K37.

Por lo tanto, pensamos que la explicación más adecuada es que el producto de dor está presente en S. typhimurium y no lo está en E. coli; ésto produce la diferencia en el comportamiento entre ambas bacterias. En S. typhimurium, la acción de este gen en la recombinación de las IS₁ debe de estar regulada por la topología del DNA, la cual puede modificarse por la acción del SE del DNA y tal vez también de IHF. En E. coli, el IHF puede actuar bloqueando las IS₁ a la acción de las enzimas de recombinación de secuencias homólogas generales en la IHF⁺, y no hacerlo en la cepa IHF⁻.

Para analizar el papel del SE en la recombinación de las IS₁, proponemos realizar experimentos de estabilidad de plásmidos FII en las cepas de E. coli K1299 con el DNA relajado, en la K37 con el genoma relajado a un grado de SE idéntico al que presenta la K1299, y en la cepa Su695 de S. typhimurium con diferentes grados de SE, con el fin de determinar cuál es el rango en el que el SE aumenta la recombinación de las IS₁.

Con el fin de estudiar el papel del gen dor en la recombinación de las IS₁, se podría introducir el gen dor en la bacteria E. coli IHF⁺ e IHF⁻ y analizar el comportamiento de los plásmidos FII en ellas. Este estudio forma parte de un proyecto de nuestro equipo de trabajo (M.I. Garcia C., comunicación personal).

Para investigar si el IHF de S. typhimurium y E. coli tiene un comportamiento igual en ambas bacterias, sería útil hacer pruebas de unión de este factor a las IS₁, por medio de geles de retardamiento (Galas et al., 1987). Además sería interesante introducir y expresar los genes himA y himD/hip de E. coli, en una cepa de S. typhimurium. A través de ambos resultados podríamos apoyar ó descartar el bloqueo por parte del IHF ya sea hacia el producto de dor ó hacia la resolvasa.

Finalmente, sería interesante probar la estabilidad de otros plásmidos FII en las cepas IHF⁺ e IHF⁻, con el fin de descartar la posibilidad de que el represor del R1-19 en conjunción con el IHF de E. coli, sea el responsable del comportamiento descrito.

VI. CONCLUSIONES

1. La cepa de *Escherichia coli* K1299/R1-19 himA⁻ (IHF⁻) presenta una frecuencia de recombinación las IS₁ del plásmido FII R1-19, mayor que la registrada en la cepa K37/R1-19 IHF⁺, y aún mayor que la de la cepa GM33/R1-19 Hiper-rec. Esto posiblemente se debe a que las IS₁ no están bloqueadas por el IHF, y pueden actuar mejor las enzimas de recombinación general.

2. La cepa K1299 mostró no tener un comportamiento hiper-mutante ni hiper-recombinante entre secuencias homólogas plasmidicas ni cromosómicas. Por lo tanto, en la K1299 el incremento en la recombinación intraplasmidica de las IS₁ del R1-19 no se debe a un incremento en la recombinación de secuencias homólogas distintas de IS₁.

3. El tipo de recombinación más frecuente en el plásmido R1-19 fue entre las IS₁ más alejadas (IS_{1a}-IS_{1b}) y el menos frecuente fue entre las IS₁ más cercanas (IS_{1b}-IS_{1c}). No se registraron eventos de recombinación entre IS_{1a}-IS_{1c}. Esto puede deberse a que IS_{1a} e IS_{1b} tienen una similitud mayor, ó que están situadas a una distancia óptima para poder recombinar.

4. La cepa GM33 dam⁻ descrita como cepa Hiper-rec para secuencias homólogas plásmido-cromosoma, no es Hiper-rec en la recombinación inter ó intraplasmídica ni en la recombinación cromosoma-cromosoma.

5. Los geles de agarosa con cloroquina [9 µg/ml] fueron adecuados para obtener una buena comparación del grado de SE del plásmido pMS01 en las cepas K37, K1299 y Su695 en cualquier fase de crecimiento, así como en presencia y ausencia de novobiocina. Los geles de agarosa con cloroquina [25 µg/ml] permitieron comparar el SE del pMS01, únicamente entre las cepas K37 y K1299 en condiciones de "estrés nutricional".

6. La novobiocina afecta el grado de SE del pMS01 y la fisiología celular de la cepa K37 en formas distintas, en relación inversa a la aereación del cultivo. En la cepa K1299, el hecho de tener un grado de SE menor que la K37, parece no ser el único factor que disminuye su velocidad de crecimiento.

7. La cepa K1299 tiene un grado de SE menor a la cepa K37. Esta diferencia aumenta al avanzar en la curva de crecimiento de ambas cepas. El grado de SE del pMS01 de la cepa K37 cultivada con novobiocina [80 µg/ml] es menor que el de la cepa K1299. En la cepa K37/R1-19 cultivada con esta concentración de novobiocina, se disminuyó la frecuencia de recombinación de las IS₁ del R1-19, posiblemente como resultado de una mala acción de las enzimas de recombinación general sobre un DNA muy relajado.

8. El pMS01 en la cepa Su695 de S. typhimurium tiene un grado de SE menor que el de E. coli K37 y ligeramente mayor al de la K1299. El grado de SE de la Su695 cultivada sin y con novobiocina [80 ug/ml] no mostró diferencias tan grandes como las observadas en E. coli. Sin embargo, cuando se cultivó con novobiocina, la cepa Su695/R1-19 si mostró un incremento en la frecuencia de recombinación de las IS₁ del R1-19. Esto puede deberse a que en esta cepa actúa un sistema de recombinación específico para las IS₁, el cual que no está presente en E. coli. Al parecer, este sistema funciona mejor con un DNA ligeramente más relajado que el normal.

VII. REFERENCIAS

- Bachamann, B.J. 1987. Linkage Map of E. coli K12, Edition 7. En, Neidhard, F.C. (ed.) E. coli y S. typhimurium. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Balke, V.L. y J.D. Gralla. 1987. Changes in the Linking Number of Supercoiled DNA Accompany Growth Transition in Escherichia coli. J.Bact. 169: 4499-4506
- Berg, D.E., T. Kazic, S.H. Phadnis, K.W. Dodson y J.K. Lodge. 1988. Mechanism and Regulation of Transposition. En A.J. Kingsman, K.F. Chater y S.M. Kingsman (ed.), Transposition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bustos Martinez, J.A. 1986. Comportamiento de un elemento Genético Móvil (Secuencia de Inserción IS₁) en Diferentes Enterobacterias. Tesis de Maestria. Facultad de Química, UNAM.
- Bustos Martinez, J. A., y M. C. Gomez-Eichelmann. 1987. Frequency of IS₁-mediated molecular events in different members of the family Enterobacteriaceae. J. Bacteriol. 169:4946-4949.
- Cruz Reyes J. y M. C. Gómez Eichelmann. 1984. Rearreglos Moleculares Independientes de recA entre Plásmidos R del Grupo de Incompatibilidad FII. Rev. Lat-amer. Microbiol. 26: 335-345.
- Chandler, M., B. Allet, E. Gallay, E. Boy de La Tour y L. Caro. 1977. Involvement of IS₁ in the Dissociation of the r-determinant and RTF Components of the Plasmid R100.1. Mol. Gen. Genet. 153:289-295.
- Chandler, M., M. Clerget, y L. Caro. 1980. IS₁ promoted events associated with drug-resistance plasmids. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45:157-165.

Chandler, M., y D. J. Galas. 1985. Studies on the transposition of IS₁, p. 53-77. En D. R. Helinski, S. N. Cohen, D. B. Clewell, D. A. Jackson, y A. Hollander (ed.), Plasmids in bacteria. Plenum Press. New York.

Chernin, L. S. y M.I. Ovdais. 1980. Plasmid Control of Recombination in E. coli K12. MGG 179: 399-407.

Dorman, C.J., G.C. Barr, N.N. Bhriain y C.F. Higgins. 1988. DNA Supercoiling and the Anaerobic y Growth Phase Regulation of tonB Gene Expression. J.Bact. 170: 2816-2826.

Drlica, K. 1984. Biology of Bacterial Deoxyribonucleic Acid Topoisomerases. Microbiol. Biol. 48: 273-289.

Drlica, K. y J. Rouviere-Yaniv. 1987. Histonelike Proteins of Bacteria. Microbiol. Rev. 51: 301-319.

Friedman, D.I., E.J. Olson, D. Carver y M. Gellert. 1984. Synergistic Effect of himA and gyrB Mutations: Evidence that Him Functions Control Expression of liv and xil Genes. J. Bact. 157: 484-489.

Friedman, D. I. 1988. Integration host factor: a protein for all reasons. Cell 55: 545-554.

Gellert, M., R. Menzel, K. Mizuuchi, M.H. O'Dea y D.I. Friedman. 1983. Regulation of DNA Supercoiling in Escherichia coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 763-767.

Gamas, P., M. G. Chandler, P. Prentki, y D. J. Galas. 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. 195: 261-272.

Gómez Eichelmann, M. C. 1981. Effect of Nalidixic Acid and Novobiocin on pBR322 Genetic Expression in Escherichia coli Minicells. J. Bact. 148: 745-752.

Gómez Eichelmann, M. C. 1982. Elementos Transponibles en Procariontes. En Mensaje Bioquímico Vol. V., Y. Saldaña de Delgadillo, S. Morales López y A. Brunner Liesbard. UNAM. 75-85.

- Gomez Eichelmann, M. C. y H. K. Torres. 1983. Stability of plasmids R1-19 and R100 in hyper-recombinant Escherichia coli and in Salmonella typhimurium strains. J. Bacteriol. 154:1493-1497.
- Gómez Eichelmann, M. C. 1983. Estabilidad y Expresión Genética de Plásmidos R en E. coli. Bol. Estud. Méd. Biol. Méx. 32:197-208.
- Gómez Eichelmann, M. C. 1988. Los Plásmidos Bacterianos y la Resistencia a los Antimicrobianos y al Suero. En, Aspectos Moleculares de la Patogenicidad Bacteriana. R. Cabrera y P. Gómez. UAM, 131-144.
- Goldstein, E. y K. Drlica. 1984. Regulation of bacterial DNA supercoiling: Plasmid linking numbers vary with growth temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4046-4050.
- Higgins, C.F., C.J. Dorman, D.A. Stirling, L. Waddell, I.R. Booth, G. May, y E. Bremer. 1988. A Physiological Role for DNA Supercoiling in the Osmotic Regulation of Gene Expression in S. typhimurium and E. coli Cell 52:569-584
- Higgins, N.P., D.A. Colliard, M.W. Kilpatrick y H.M. Krause. 1989. Supercoiling and IHF Change the DNA Conformation and Alter the Flow of Convergent Transcription in Phage Mu. J. Biol. Chem. 264: 3035-3042.
- Hu, S., E. Othsubo, N. Davison, y H. Saedler. 1975. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among bacterial plasmids: Identification and mapping of the insertion sequences IS1 and IS2 in F and R plasmids. J. Bacteriol. 122:764-775.
- Jakowec, M., P. Prentki, M. Chandler y D.J. Galas. 1988. Mutational Analysis of the Open Reading Frames in the Transposable Element IS1. Genetics 120: 47-55.
- Kleckner, N. 1977. Translocatable Elements in Procaryotes. Cell. 11: 11-23.
- Kolodner, R., 1980. Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: Electron microscopic analysis of in vitro intramolecular recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4847-4851

- Konrad, E.B. 1977. Method for the Isolation of Escherichia coli mutants with enhanced recombination Between Chromosomal Duplications. J. Bacteriol. 130:167-172.
- Lewin, B. 1987. Genes III. New York: John Wiley & Sons.
- Li, Z.J., D. Hillyard y P. Higgins. 1989. Nucleotide Sequence of the S. typhimurium hima gene. Nucleic Acid Research 17:8880.
- Low, K.B. 1987. Hfr Strains of E. coli K12. En, Neidhard, F.C. (ed.) E. coli and S. typhimurium. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Liebart, J.C., L. Paolozzi, M.G. Camera, A.M. Pedrini y P. Ghelardini. 1989. The expression of the DNA ligase gene of E. coli is stimulated by relaxation of chromosomal supercoiling. Mol. Microbiol. 3: 269-273
- Lodge, J.K., T. Kazic y D.E. Berg. 1989. Formation of Supercoiling Domains in Plasmid pBR322. J. Bact. 171:2181-2187.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, y J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Marinus, M.G. y E.B. Konrad. 1976. Hyper-recombination in dam Mutants of E. coli K12. Mol. Gen. Genet. 149: 237-277.
- Martinez Salazar, J. M. 1983. Frecuencia de los Diferentes Determinantes Genéticos de Resistencia a Tetraciclina en Shigella sp. y Salmonella sp. Aisladas en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Martinez Salazar, J. M. y M.C. Gómez Eichelmann. 1987. Molecular Rearrangements between Two Plasmids do the FII Incompatibility Group in Different Recombination-Deficient E. coli Strains. Plasmid 18:237-245.
- Miller, H.I. 1984. Primary Structure of the hima Gene of E. coli: Homology with DNA-Binding Protein HU and Association with the Phenylalanyl-tRNA Synthetase Operon. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 49: 691-698.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Pettijohn, D.E. 1988. Histone-like Proteins and Bacterial Chromosome Structure. J. Biol. Chem. 263:12793-12796.

Sheikh, M.S. y P. Margolin. 1989. Role of Modifier Mutations in Phage P22 Plaques Morphology in S. typhimurium topA Mutants. Resumen del Congreso de CSH, N. Y. USA.

Smith, C.L., 1983. recF-dependent induction of recA synthesis by coumermycin, a specific inhibition of the B subunit of DNA gyrase. Proc. Natl. Acad. Sic. USA. 80 :2510-2513.

Watanabe, H., K. Mise y H. Hashimoto. 1982. Recombination between two IS₁s flanking the r-det determinant of R100-1: Involvement of dor and recA gene functions in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 150:113-121.

Xu, B., C. Paszty y P.F. Lurquin. 1988. A Plasmid-Based Method to Quantitate Homologous Recombination Frecuencies in Gram-Negative Bacteria. BioTechniques 6: 752-760.

Zerbib, D., M. Jakowec, P. Prentki, D. J. Galas, y M. Chandler. 1987. Expression of proteins essential for IS₁ transposition: specific binding of InsA to the ends of IS₁. EMBO J. 6:3163-3169.