

## Genética Bacteriana 2018



1. Qué son mutantes auxotróficas? Cómo aislaría una mutante auxotrófica de *E.coli* que requiera arginina y fenilalanina para crecer?

2. Identifique cada uno de los siguientes tipos de *E. coli*:  $F^+$ ,  $F^-$ , Hfr,  $F'$ .

3. Se realizó el siguiente experimento:  $10^7$  células de la cepa 1 de *E. coli* que requiere prolina y tiamina fueron mezcladas con  $10^7$  células de la cepa 2 que requiere metionina y leucina en volumen final de 100uL. Luego de 30 min. de incubación se hicieron diluciones seriadas 1/10 de la mezcla y un décimo de cada dilución se sembró en cajas de Petri de medio mínimo (conteniendo glucosa como único sustrato orgánico). Luego de incubar durante toda la noche se obtuvieron en la dil  $10^{-2}$  310 UFC y en la dilución  $10^{-3}$  34 UFC.

- Indique el genotipo de la cepa 1 con respecto a sus requerimientos nutricionales de prolina, tiamina, leucina y metionina, considerando que cada uno de los requerimientos es debido a un único gen.
- Calcule la frecuencia con la cual se obtuvieron protótrofos. Considerando que la frecuencia de reversión espontánea de cada gen mutado es de  $10^{-7}$ , proponga explicaciones para el resultado obtenido.
- Explique el mecanismo por el cual pueden haberse obtenido los protótrofos a partir de las cepas originales.
- Qué características deben presentar las cepas en cuestión?
- En un experimento similar, con otras dos cepas con iguales características fenotípicas que las de las utilizadas en este experimento, se obtuvieron protótrofos con una frecuencia de  $10^{-6}$ . Cómo podría explicar este resultado?

4. Se cuenta con tres cepas:

I- Hfr, sensible a estreptomycinina ( $Str^S$ ), capaz de crecer con lactosa como única fuente de carbono ( $lac^+$ ) y capaz de sintetizar todos los aa.

II-  $F^-$  resistente a estreptomycinina ( $Str^R$ ),  $lac^-$  y auxótrofa para metionina ( $met^-$ ).

III-  $F^-$ , resistente a estreptomycinina ( $Str^R$ ),  $lac^-$  y auxótrofa para arginina ( $arg^-$ ).

Se ponen en contacto por un lado las cepas I y II y por otro I y III, y a distintos tiempos se plaquean 20  $\mu$ l de la mezcla en medios conteniendo estreptomycinina y además

- medio mínimo con lactosa como única fuente de carbono (medio LAC).
- medio mínimo con glucosa y todos los aminoácidos excepto metionina (medio SIN MET)
- medio mínimo con glucosa y todos los aminoácidos excepto arginina (medio SIN ARG)

Se cuentan las colonias y se obtiene:

	5 min			10 min			20 min		
	LAC	SIN MET	SIN ARG	LAC	SIN MET	SIN ARG	LAC	SIN MET	SIN ARG
I x II	-	-	200	15	2	200	43	15	200
I x III	-	200	10	5	200	30	24	200	80

- Determine el orden de los genes lac, arg y met en el cromosoma, entre sí y con respecto a la inserción de F.
- Qué resultado habría esperado si se hubiera omitido el antibiótico en los medios selectivos? JUSTIFIQUE

3- Si Ud. quiere construir una cepa  $lac^+ arg^-$ , y cuenta con la cepa III y con una cepa  $lac^+ arg^+$  no conjugativa, qué procedimiento podría utilizar? Describa a grandes rasgos el procedimiento, y cómo seleccionaría e identificaría la cepa deseada.

5. Durante el desarrollo de vectores que pudieran utilizarse para transformar tanto *E. coli* como la haloarquea *Haloferox volcanii* (vectores "shuttle", por su capacidad de replicarse en una u otra especie), se encontró lo siguiente:

- Se construyó el plásmido pMDS1 con dos orígenes replicación, uno activo en *E. coli* y el otro activo en *H. volcanii*. Las manipulaciones se hicieron sobre plásmidos extraídos de *E. coli*.
- Este vector permitió la transformación de células de *E. coli* con eficiencia normal, pero apenas si daba lugar a alguna transformante cuando se intentaba transformar células de *H. volcanii*.
- Otros plásmidos extraídos de *H. volcanii* permitieron la transformación de células de *H. volcanii* con eficiencia normal.

Para tratar de dilucidar cuál era la causa de estas variaciones se transformaron células de *H. volcanii* con el plásmido pMDS1 purificado a partir de diferentes cepas de *E. coli* (una cepa salvaje y dos con defectos en las enzimas que metilan el DNA, cuyos genes se denominan *dcm* y *dam*) o de una cepa de *H. volcanii*. En la tabla se muestra el número de transformantes obtenidas en cada caso por  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico (**eficiencia de transformación**):

Plasmid DNA source	Methylation genotype <sup>a</sup>	<i>H. volcanii</i> Nov <sup>r</sup> transformants/ $\mu\text{g}$ of pMDS1
<i>E. coli</i>		
JM101	<i>dam</i> <sup>+</sup> <i>dcm</i> <sup>+</sup>	$2.5 \times 10^2$
JP3477	<i>dam</i> <i>dcm</i> <sup>+</sup>	$3 \times 10^5$
JM110	<i>dam</i> <i>dcm</i>	$5 \times 10^5$
<i>H. volcanii</i> WFD11		$10^6$

<sup>a</sup> *dam*<sup>+</sup> strains have methylated A residues in the sequence GA<sup>m</sup>TC; *dcm*<sup>+</sup> strains have methylated C residues within the sequence CC<sup>m</sup> ( $\frac{A}{T}$ ) GG (19).

Nov<sup>R</sup> indica resistencia al antibiótico novobiocina, que fue el marcador de selección utilizado.

Cómo explicaría Ud estos resultados?

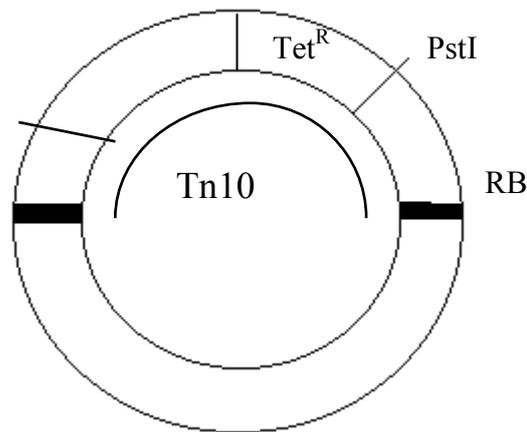
6. Se está estudiando el mecanismo de invasión de *Salmonella thyphi* en cultivos de células de epitelio intestinal humano. Se transforman células de *S. t.* con un transposón TnK que es defectivo en transposasa (se integra una vez y queda allí) y contiene un gen de resistencia a Kanamicina sin su promotor y resistencia a Ampicilina. Se seleccionan las bacterias que son resistentes a Ampicilina y sensibles a Kanamicina. Se ponen en contacto con una capa de células de epitelio intestinal previamente fijadas con glutaraldehído (en estas condiciones las bacterias pueden adsorberse a las células epiteliales vía receptores específicos pero no pueden continuar la invasión a las células). Se seleccionan las resistentes a Kanamicina.

- a. Qué característica/s poseen las bacterias descartadas en la primera selección?
- b. Por qué las bacterias de la segunda selección han adquirido resistencia a Kanamicina?

c. Proponga los pasos a seguir con alguna de las bacterias que ha seleccionado para continuar este estudio.

7. En su laboratorio se pretende clonar en *E.coli* el operón que codifica para enzimas que catalizan la síntesis de aminoácidos aromáticos. Para ello cuenta con los siguientes elementos:

- Cepa bacteriana de *E.coli*, salvaje.
- Capacidad de transformación, construcción de bibliotecas y screening.
- Plásmido pUC Tn10 Tet<sup>R</sup> (resistencia a tetraciclina) con el ori deletado.



LB y RB son brazos izquierdo y derecho del transposón.

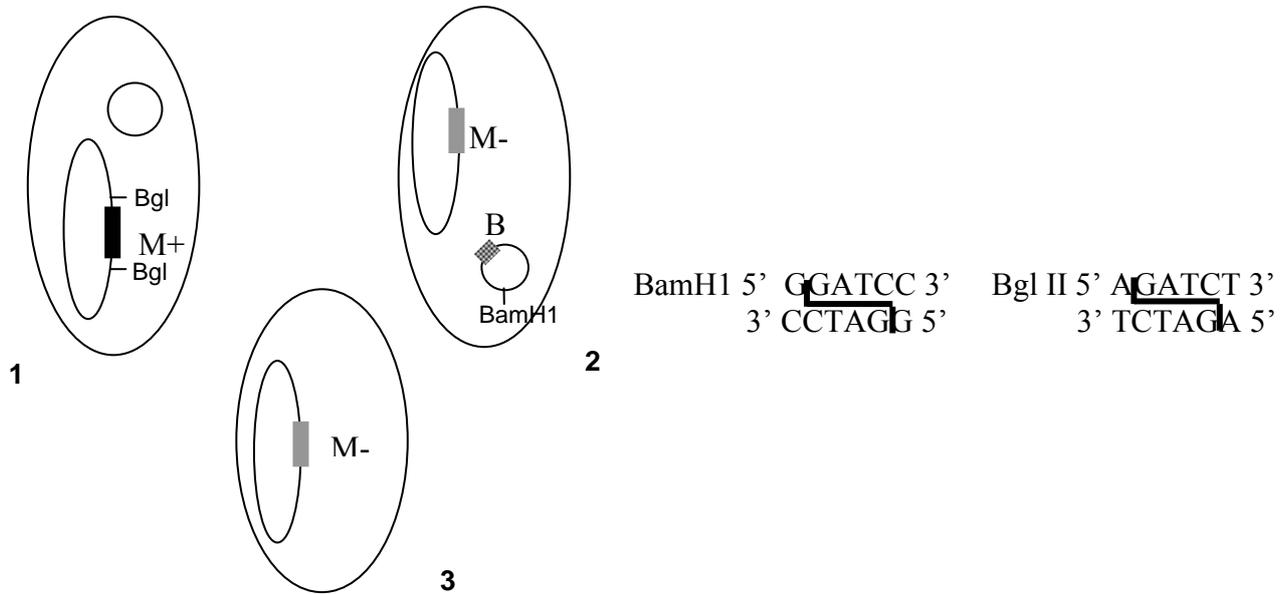
Nota: Este plásmido está construido de modo tal que el transposón Tn10 una vez insertado en el DNA pierde la capacidad de volver a transponerse.

- Una biblioteca genómica de *E.coli* salvajes en el plásmido pS Cm<sup>r</sup> (resistencia a cloranfenicol).

Se transformaron *E coli* salvajes con pUC Tn10 Tet<sup>r</sup> y se obtuvieron mutantes para la síntesis de aminoácidos aromáticos.

- Cómo seleccionaron estas mutantes?
- Describa una estrategia para lograr el clonado del operón salvaje.
- Cómo probaría que el clon obtenido corresponde efectivamente al operón buscado?

8. Se dispone de tres cepas de *E. coli*: 1, 2 y 3. La cepa 1 es F<sup>+</sup>, susceptible a la infección por el fago P1, no productora de bacteriocinas y capaz de crecer en ausencia de metionina exógena (Met<sup>+</sup>). La cepa 2 posee un gen para la síntesis de bacteriocinas en un plásmido conjugativo (F), es auxótrofa para metionina (Met<sup>-</sup>) y no es susceptible a la infección por P1. La cepa 3 es F<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>, no produce bacteriocinas y es susceptible a la infección por P1 y transformación.



B: gen necesario para la síntesis de bacteriocina

M: gen necesario para la síntesis de metionina

**Nota:** Se dispone de un método sencillo para la detección de la producción de bacteriocinas en placa, fago P1, métodos de purificación de plásmidos y transformación, herramientas de biología molecular, protocolos de conjugación, etc.

Teniendo en cuenta estos datos, diseñe una posible estrategia para la obtención de una cepa productora de bacteriocinas, capaz de crecer en un medio sin metionina. Indique qué medios de selección utilizaría.

9. Un investigador modificó una cepa de *E. coli* (A)  $Arg^-$  y sensible a gentamicina (receptiva a la transformación, transducción y conjugación) generando una cepa protótrofa (B) resistente al antibiótico. Posteriormente, un ayudante realizó los siguientes ensayos con alícuotas de las células tipo B para verificar los resultados:

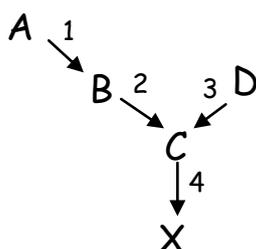
- 1) Incubó en medio líquido mínimo (sin Arg) durante 72 hs con sucesivos pasajes y, posteriormente, sembró una placa de medio rico con Gentamicina...no obtuvo crecimiento.
- 2) Incubó en medio rico con gentamicina durante 72 hs con sucesivos pasajes y, posteriormente, sembró una placa de medio mínimo...obtuvo colonias siendo el número igual al obtenido en medio mínimo + Arg.

Preguntas:

a) Interprete y justifique los resultados obtenidos.

b) Describa las características de las cepas involucradas y los pasos realizados para la obtención de la cepa B.

10. La vía metabólica para la síntesis del metabolito esencial X es como sigue:



A,B,C y D: precursores de X

1,2,3 y 4: enzimas que catalizan cada uno de los pasos.

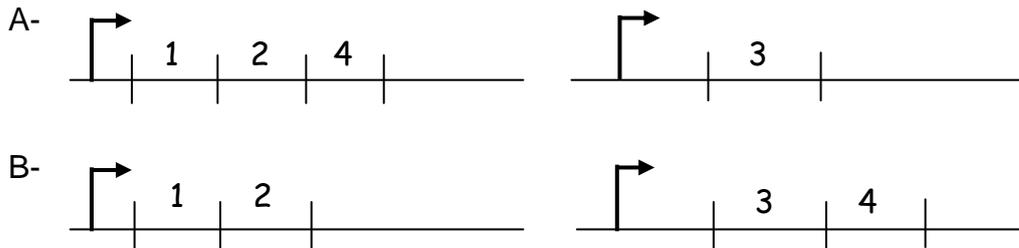
La cepa wt es capaz de crecer si en el medio está presente X o cualquiera de los precursores (A,B, C o D)

Se cuenta con dos cepas que presentan distintas mutaciones en el gen de la enzima 1.

La cepa mutante I es sensible a estreptomycinina ( $Str^S$ ), crece si en el medio hay X, B, C ó D, pero no crece cuando la única adición al medio es A.

La cepa mutante II es resistente a estreptomycinina ( $Str^R$ ), y sólo es capaz de crecer cuando en el medio se adiciona X.

- Cómo explica que las dos mutantes en el mismo gen tengan distintos requerimientos nutricionales?
- De los siguientes ordenamientos de genes posibles, indique cuál es compatible con los resultados observados:



 Promotor    1,2,3,4: genes que codifican las enzimas correspondientes

- Se hizo un lisado de fago P1 en la cepa I, y con ese lisado (libre de células) se infectó la cepa II. Luego de la adsorción del fago, las células se plaquearon en medio mínimo con B como único precursor de X. Qué característica presentan las células que crecieron en este medio?
- Cómo comprobaría que las colonias crecidas corresponden a la cepa II que ha adquirido material genético por transducción, y no a una contaminación con la cepa I (que también es capaz de crecer con B como precursor de X)?

11. Se tienen dos cepas de *E. coli* protótrofas (A y B) que son resistentes a Tetraciclina (Tet) gracias a la inserción del transposón Tn10 en distintos lugares del genoma. Por otro lado, se tiene una cepa sensible a Tet y auxótrofa para Met (cepa C).

Nota: Considerar que la inserción del transposón Tn10 es estable, que no existe transposición a una frecuencia detectable.

Se preparan lisados de P1 en A y en B y con estos lisados libres de células se infecta por separado a la cepa C. Luego de la adsorción se plaquean las células en medio con Tet. Se analizan las colonias individuales con respecto a su capacidad de crecer en medio mínimo sin Met. Se analizan 200 colonias de cada cruce y se obtiene:

P1 (cepa A) x cepa C     $\longrightarrow$     50 colonias son capaces de crecer sin Met.  
 P1 (cepa B) x cepa C     $\longrightarrow$     2 colonias son capaces de crecer sin Met.

- Qué conclusión puede sacar con respecto al sitio de inserción de Tn10 en las cepas A y B?
- Usted quiere construir una cepa que es auxótrofa para Met y Arg, y cuenta con una cepa que es auxótrofa para Arg y sensible a Tet. Usando las bacterias que obtuvo de alguna de las cruces anteriores, piense un procedimiento para construir la cepa deseada. Considere inicialmente que los genes met y arg están distantes entre sí. Qué cuidados debería tener si estos genes estuvieran cerca dentro del cromosoma?

12. Se desea identificar **todas las proteínas que se exportan al espacio periplásmico o al medio extracelular** en *E. coli*. Para ello, se lleva a cabo una estrategia que involucra la inserción al azar de un transposón en distintas regiones del cromosoma bacteriano, la posterior identificación de aquellos eventos de inserción cuyo blanco fue alguna de las proteínas de exportación, y la posterior remoción del transposón utilizado.

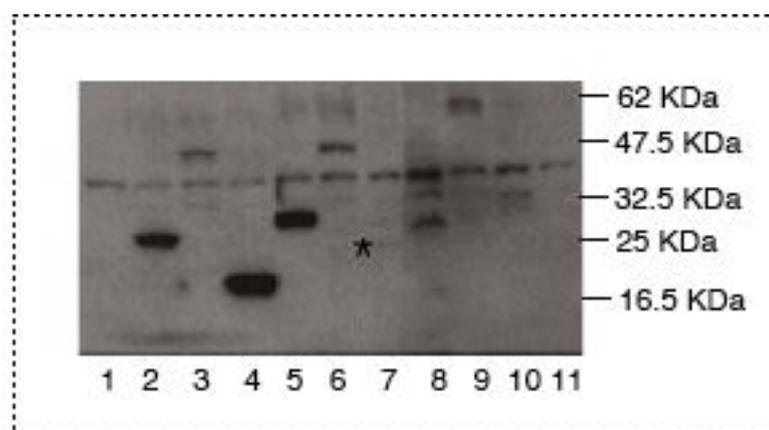
El transposón IS *phoA/hah* posee el gen de fosfatasa alcalina (*phoA*) sin las secuencias responsables de su inserción en la membrana, el gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y un sitio de recombinación específico en cada extremo (*loxP*). Cuando el mismo se inserta con una apropiada orientación y marco de lectura en un gen que expresa una proteína de exportación, puede crear un gen activo de fusión con AP (fosfatasa alcalina). Una consideración importante a tener en cuenta para comprender esta estrategia experimental es que la fosfatasa alcalina no puede plegarse correctamente en el citoplasma y para ser activa requiere de su exportación.

**Parte 1: inserción del transposón.** Para crear la biblioteca de inserción se conjugaron bacterias que contenían un plásmido con el transposón IS *phoA/hah* con bacterias receptoras y se plaquearon en un medio que contenía un sustrato de la AP y cloranfenicol. El sustrato utilizado adquiere color azul al ser hidrolizado. Al día siguiente se observaron en las placas algunas colonias azules y otras blancas.

- ¿Qué característica tienen las colonias azules con respecto a la localización de la secuencia de inserción?
- ¿Qué característica tienen las colonias blancas con respecto a la localización de la secuencia de inserción? (crecieron en el medio con cloranfenicol)

**Parte 2: remoción del transposón.** La recombinasa *cre* permite la recombinación homóloga de los sitios *loxP*, eliminándose así las secuencias correspondientes al transposón insertado, excepto por una secuencia de 189 pb que permanece en el sitio de inserción. Esta secuencia codifica para un epítipo de reconocimiento de la hemaglutinina de la influenza (HA).

Se realizó la co-expresión de *cre* en las células de la biblioteca de inserción. Las proteínas totales de algunas cepas obtenidas fueron sembradas en un gel y luego se realizó un Western blot revelado con anticuerpo anti HA (Fig.1).



**Figura 1:** Western con anti HA.

Calles: 1 y 11 células sin expresar *cre*; 2 a 10: diferentes cepas obtenidas (colonias azules).

- indica una banda tenue.

c. Analice la figura 1, y explique por qué las bandas inmunorreactivas tienen distinta movilidad e intensidad.

**13.** Un grupo de investigadores que está estudiando la aparición de cepas resistentes a antibióticos en el hospital de Rosario caracterizó un aislamiento resistente a carbapenemes. Este aislamiento se denominó *Acinetobacter baumannii* R1 y su estudio permitió las siguientes conclusiones:

- R1 carece de la proteína de membrana CarO que es esencial para la permeabilidad al compuesto.
- El aislamiento R1 puede distinguirse de los aislamientos sensibles (S) por tratamiento con un análogo coloreado no tóxico del carbapenem que sólo puede ingresar a las células S por poseer la proteína CarO, dando origen a colonias verdosas.

Médicos de hospitales en Salta y Córdoba aislaron otras cepas de *A. baumannii* que presentaban altos niveles de resistencia a carbapenemes. Estas cepas fueron llamadas R2 y R3 respectivamente, y enviadas al grupo de Rosario con el fin de investigar el origen de la resistencia de los nuevos aislamientos.

**Exp.1:** Las cepas S, R1, R2 y R3 fueron estriadas sobre medio que contenía el análogo coloreado de carbapenemes. La cepa S dio origen a colonias verdosas, mientras que las cepas R1, R2 y R3 dieron origen a colonias blancas.

**Exp.2:** Se preparó un lisado de P1 sobre la cepa S y con éste se infectaron separadamente las cepas R1, R2 y R3, con el fin de obtener transductantes. Las bacterias resultantes se plaquearon en alta densidad sobre medio con análogo coloreado.

En los tres casos se observó la aparición de colonias verdosas con muy baja frecuencia.

**Exp. 3:** Se preparó un lisado de P1 sobre la cepa R1 y con éste se infectaron separadamente las cepas R2 y R3 con el fin de obtener transductantes y se plaquearon las bacterias resultantes sobre medio con análogo coloreado.

En el primer caso [P1 (R1) sobre R2] se volvieron a obtener colonias verdosas con muy baja frecuencia.

En el segundo caso [P1(R1) sobre R3] no se obtuvo ninguna colonia vercosa aun después de analizar un elevado número de bacterias y repetir varias veces el experimento de transducción.

### Preguntas

- a) Cómo interpreta el resultado del experimento 2? Analice en detalle la metodología. Qué representa la gran mayoría de células blancas obtenida en cada una de las tres transducciones?
- b) Interprete el experimento 3. Cómo explica la aparición de algunas colonias sensibles en una de las cruces ?
- c) Qué puede decir sobre la mutación responsable de la resistencia a carbapenemes de R1, R2 y R3?
- d) Se cuenta con un plásmido suicida que contiene una copia salvaje del gen de la proteína X, y un sistema que permite asegurar la incorporación de este gen en el cromosoma por recombinación homóloga, reemplazando la copia existente. Se transforman las cepas R1, R2 y R3 con este plásmido y, luego de seguir el procedimiento para asegurar el reemplazo génico, se estrían las cepas resultantes (R1-X salvaje, R2-X salvaje y R3-X salvaje) sobre medio con el análogo coloreado de carbapenemes. Las cepas R1-X salvaje y R3-X salvaje dieron origen a colonias

verdosas, mientras que la cepa R2-X salvaje dio origen a colonias blancas. Cómo puede explicar este resultado?

**14.** Se tiene una cepa de *E. coli* auxótrofa para Arg e His, (cepa 1) y una cepa protótrofa que puede crecer en ausencia de todo aminoácido (cepa 2). Se hace un lisado de fago P1 sobre la cepa 2 y se comprueba en éste la ausencia de contaminación bacteriana.

Se toma un cultivo de la cepa 1, se divide en dos tubos y se les agrega: a- nada (control no infectado) o b- una alícuota del lisado de P1 sobre la cepa 2. Luego de incubar a 37 °C y seguir el procedimiento necesario para que los fragmentos de DNA transducidos puedan sufrir recombinación, las bacterias resultantes fueron plaqueadas en:

- 1- Medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y todos los aminoácidos
- 2- Medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y todos los aminoácidos menos Arg

**Pregunta a:** Complete el siguiente cuadro indicando qué espera encontrar en cada placa. Especifique qué tipo de bacteria crecerá en cada caso y su origen.

	a- Tubo no infectado	b- Tubo infectado
1 (M. mínimo + 20 aa)		
2 (M. mínimo + 19 aa)		
3		

**Pregunta b:** Se tomaron 50 colonias de la placa 2b y se estiraron en medio mínimo con todos los aminoácidos menos Arg e His, y las 50 colonias crecieron en este nuevo medio. Cómo interpreta este resultado? Si en vez de analizar 50 colonias hubiera analizado 1000 hubiera esperado el mismo resultado? Justifique.

**Pregunta c:** complete el 3<sup>er</sup> renglón del cuadro anterior usando Medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y ningún otro agregado.

En el laboratorio se encuentran una serie de bacterias, derivadas de la cepa 2, rotuladas como Hfr X y HfrZ, y se hace un experimento de conjugación interrumpida entre estas cepas y la cepa 1. Al cabo de diversos tiempos de incubación se interrumpe la conjugación y se plaquean las bacterias en medio sin Arg o sin His, y con un antibiótico que elimina la cepa dadora y se obtiene lo siguiente:

	0 min		5 min		20 min	
	Sin Arg	Sin His	Sin Arg	Sin His	Sin Arg	Sin His
HfrX + cepa1	-	-	10	-	58	-
HfrZ + cepa1	-	-	2	6	15	48

**Pregunta d:** Le parece que los resultados del experimento de conjugación son consistentes con los resultados de la transducción? Infiera la posición del factor F en el cromosoma de las dos cepas Hfr. **Justifique.**

## Problemas anexos guía genética (problemas de parcial de años anteriores)

1- Una cepa X, productora de una toxina de interés, es auxótrofa para serina debido a una mutación en el gen *ser1*. Con el objetivo de eliminar la auxotrofia a serina, tres estudiantes eligen caminos alternativos:

- el estudiante A transforma la cepa X con un plásmido de expresión que codifica la proteína Ser1 bajo el control de un promotor inducible. Luego de transformar la cepa X con el plásmido y seleccionar las células transformantes por una resistencia a antibiótico también codificada en el plásmido, las células son plaqueadas sobre medio mínimo que contiene el inductor del gen *ser1* y todos los aminoácidos con la excepción de serina
- el estudiante B prepara un lisado de fago P1 libre de células sobre una cepa protótrofa. Con ese lisado infecta la cepa X, y luego de la adsorción agrega citrato al medio con el fin de evitar posteriores infecciones. Luego de un tiempo, las células son plaqueadas sobre medio mínimo que contiene todos los aminoácidos con la excepción de serina
- el estudiante C toma una cepa Hfr, protótrofa y no productora de toxina, y realiza un experimento de conjugación. Para ello incuba juntas las dos cepas y las deja en contacto durante media hora. Luego de ese tiempo, las células fueron centrifugadas y resuspendidas, y plaqueadas sobre medio mínimo que contiene todos los aminoácidos con la excepción de serina.

Después de incubar las placas por toda la noche a 37 °C, el estudiante A encuentra su placa vacía, el B encuentra 30 colonias y el C más de 500 colonias.

a- El estudiante A cree que falló algo de su plásmido de expresión. Considerando que puede disponer de las herramientas que desee, mencione algún experimento para comparar la cepa X con la cepa transformada en condiciones de inducción, con el fin de corroborar que el plásmido dirige la expresión de Ser1.

b- Luego de sus experimentos de control, el estudiante A comprueba que el plásmido de expresión funciona correctamente, y que las condiciones de inducción son adecuadas. Puede ofrecer alguna explicación para el hecho de que no obtuvo ninguna colonia capaz de crecer en ausencia de serina?

c- El estudiante B toma las 30 colonias obtenidas, y las somete a un test para medir la producción de la toxina. Sólo una colonia es positiva para la producción de toxina. Puede sugerir una explicación para este hecho?

d- el estudiante C toma 300 colonias y las somete al test de producción de la toxina. Cuál imagina que fue el resultado de este test? Por qué?

e- Cuál de los tres estudiantes estuvo más cerca del objetivo? Qué cambiaría en la estrategia de los otros dos? (indique cómo podría alcanzar el objetivo utilizando transformación, transducción o conjugación, para los dos casos que Ud identificó como perfectibles).

2- Se dispone de cuatro cepas de *E.coli* (A, B, C y D), todas ellas auxótrofas para treonina (Thr). Se preparó un lisado de fago P1 sobre la cepa A, y se infectaron con éste las cepas B,

C y D por separado. Luego de la adsorción y posterior tratamiento con citrato para quelar el ión calcio se obtuvo 1 ml de suspensión celular. Se prepararon diluciones seriadas 1/10 y se plaquearon 100 µl de cada dilución sobre medio mínimo conteniendo todos los aminoácidos o todos los aminoácidos menos Thr.

Se obtuvieron los siguientes resultados (nro de colonias):

	Todos los aminoácidos					Sin Thr		
	Sin dil	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	Sin dil.	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
P1 (A) x B	>500	>500	>500	302	27	45	5	0
P1 (A) x C	>500	>500	>500	230	20	0	0	0
P1 (A) x D	>500	>500	>500	350	39	7	0	0

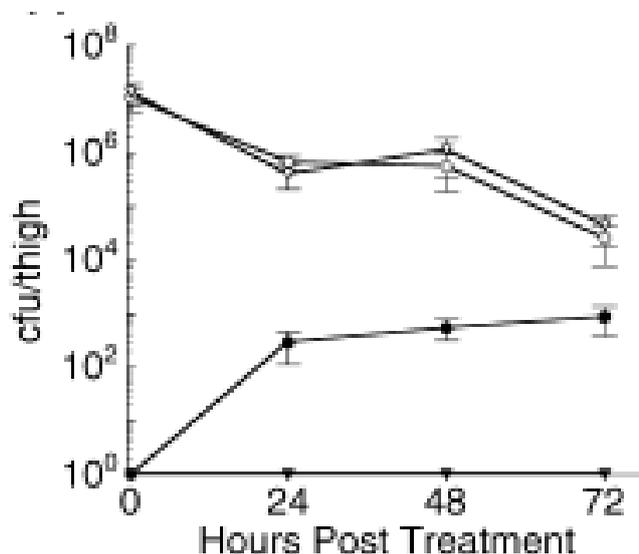
- Cómo puede explicar la aparición de colonias capaces de crecer sin Thr en P1(A) x B y P1(A) x D?
- Calcule la frecuencia con la cual se obtuvieron bacterias capaces de crecer sin Thr en cada uno de los casos. Cómo puede explicar las diferencias?
- Por qué no se obtuvieron colonias capaces de crecer sin Thr en P1 (A) x C? Sugiera una explicación.

3- Con el fin de estudiar la aparición de la resistencia a antibióticos en un sistema animal, se realizó el siguiente experimento:

-Una serie de ratones fue infectada con 10<sup>6</sup> UFC de una cepa patógena de *E. coli*. Después de la infección se suministró el antibiótico ciprofloxacina cada 12 hs, y cada 24 hs después de la infección se sacrificaron animales, se preparó un homogenato del tejido infectado, y se contaron las UFC totales y las UFC resistentes a ciprofloxacina (nota: esto se realizó preparando un homogenato del músculo infectado y plaqueando diluciones sobre medio con o sin antibiótico).

El experimento se realizó con dos variantes de la cepa patógena: una salvaje (wt) y una derivada de ésta que presenta una mutación específica en el gen *lexA* (*lexA* S119A). LexA es un represor transcripcional que es clivado y así inactivado cuando las bacterias se exponen a ciertos estreses (por ejemplo irradiación UV), permitiendo la expresión de algunos genes que están relacionados con la supervivencia frente al estrés correspondiente. La mutación S119A la torna no susceptible al clivaje, y por eso en esas mutantes LexA es un represor constitutivo de los genes que regula.

Los resultados del experimento descrito se muestran en la Fig. 1.



**Fig.1 Supervivencia y mutación de *E. coli* in vivo después de iniciar terapia con ciprofloxacina**

Se aislaron las UFC de muslos de ratones infectados a intervalos de 24 hs desde el inicio del tratamiento con el antibiótico.

Círculos y triángulos abiertos corresponden a las UFC/muslo totales de las cepas salvaje y *lexA* S119A, respectivamente. Círculos y triángulos cerrados corresponden a las UFC/muslo resistentes al antibiótico de las mismas cepas.

Para medir la velocidad con que las diferentes cepas adquirirían resistencia se realizó el siguiente experimento: se crecieron en medio líquido en ausencia de antibiótico, y se plaquearon sobre medio sólido con una concentración de ciprofloxacina a la que mutaciones únicas confieren resistencia (en el sistema animal se requieren múltiples mutaciones para desarrollar resistencia). Se contaron luego en la misma placa las colonias que se desarrollaban a medida que aparecían, en intervalos de 24 hs hasta los 4 días. Las colonias que aparecían en el primer día se atribuían a mutaciones que aparecieron antes de la exposición al antibiótico, mientras que las colonias que aparecieron más tarde se atribuyeron a mutaciones post-exposición al antibiótico. Los resultados se muestran en la Tabla I

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
<b>Salvaje</b>	2	16	40	98
<b>lexA S119A</b>	2	2	2	3

Tabla I. Nro de colonias en medio con ciprofloxacina (una sola placa, observada en días sucesivos)

**a-** Cómo podría explicar la diferencia entre las dos cepas con respecto a los resultados obtenidos en ambos experimentos?

**b-** Puede decir si la diferencia entre las dos cepas es una diferencia “constitutiva” o si sólo se hace evidente en respuesta a la exposición al antibiótico? Justifique.

**c-** Se conoce que LexA reprime la transcripción del gen que codifica una DNA polimerasa alternativa de menor fidelidad para la replicación del DNA. Se le ocurre cómo esto puede explicar los resultados observados?

**d-** Finalmente, cuál de estas aseveraciones le parece más acorde a los resultados mostrados?

- i. Las mutaciones responsables de la resistencia a ciprofloxacina aparecen siempre con la misma frecuencia y se hacen visibles cuando son seleccionadas en presencia del antibiótico en cuestión.
- ii. Las bacterias responden a la exposición a ciprofloxacina con un aumento en la tasa de mutación y eso les permite aumentar la probabilidad de generar una variante resistente.

**e-** La cepa salvaje es auxótrofa para Met mientras que lexS119A es protótrofa. Ninguna de las dos cepas es conjugativa.

Utilizando los métodos de transferencia horizontal de genes que considere indicados, plantee una forma de obtener una cepa que sea protótrofa y resistente al antibiótico.

**4-** Los investigadores de una empresa biotecnológica analizaron todas las cepas de su cepario en busca de una sobreproductora de un metabolito X. Encontraron una cepa de *Salmonella* sp. que producía dicho metabolito en cantidades importantes y bastante libre de contaminantes cuando se la crecía en medio mínimo, pero la formulación del medio resultaba complicada para un proceso industrial ya que la cepa sobreproductora era auxótrofa para histidina y fenilalanina.

Dado que en laboratorio estos investigadores contaban con otra cepa de *Salmonella* protótrofa, deciden construir una cepa que sea sobreproductora de X y además protótrofa. Para ello, preparan un lisado de fago P1 en la cepa protótrofa. Con este lisado libre de células infectan la cepa sobreproductora, y plaquean en medio sin histidina. A las doscientas

colonias que obtienen, les prueban su capacidad de crecer en medio mínimo sin fenilalanina y no encuentran ninguna que sea capaz de crecer en esas condiciones.

Entonces infectan nuevamente la cepa sobreproductora de X con el lisado de P1 sobre la cepa protótrofa, y plaquean en medio sin fenilalanina. Obtienen en este caso 300 colonias transductantes, ninguna de las cuales es capaz de crecer en medio sin histidina cuando se las prueba individualmente.

- Se le ocurre por qué los investigadores no son capaces de obtener una cepa transductante que sea capaz de crecer sin histidina ni fenilalanina en el medio?
- Puede proponer una forma de obtener la cepa deseada?

Finalmente, estos investigadores desean incorporar en la cepa sobreproductora un gen que le confiere resistencia a cierto antibiótico, y que no presenta homología con ningún gen de Salmonella

- Qué método de transferencia horizontal utilizaría?
- Si los métodos de producción del metabolito X hacen caro o complicado el cultivo de la cepa en presencia constante del antibiótico en cuestión, se le ocurre alguna forma de incorporar el gen de resistencia en el cromosoma bacteriano?