

Trabajos originales

Estudios sobre la producción de un Interferón recombinante alfa humano expresado bajo el control del promotor lac UV5 de *Escherichia coli*

A. RUIZ TREVISÁN, A. PESCE, M. CRISCUOLO, A. DÍAZ, E. CORLEY, C. DENOYA y J. ZORZOPULOS

Bio Sidus S.A., Larrea 926, 1117
Buenos Aires, Argentina

Recibido el 20 de febrero de 1986

RESUMEN

La inserción de un oligonucleótido de 18 pares de bases en el sitio PvuII, ubicado en la región que codifica para el prepeptido del gen de IFN α 2 humano, resultó en un notable incremento en la actividad antiviral producida en *E. coli* bajo el control de los promotores lac UV5 situado en un plásmido recombinante.

El máximo de actividad antiviral específica, cuando se utilizó *E. coli* HB101 como célula hospedadora, se produjo en la mitad de la fase exponencial, después de lo cual se observó una marcada caída. Cuando se utilizó *E. coli* JM101, que sólo permite la síntesis del antiviral en presencia del inductor (IPTG), el máximo se observó una hora y media después de agregado este inductor, cualquiera fuere el punto de la curva de crecimiento.

El contenido plasmídico por célula durante el ciclo de crecimiento se mantuvo constante. Cuando se amplificó el número de copias del plásmido por pretratamiento de las bacterias con cloranfenicol, se amplificó la capacidad de síntesis en los puntos iniciales de la curva de crecimiento. La vida media del antiviral en extractos bacterianos crudos fue de 75 minutos a 37°C y 165 minutos a 30°C. La disminución de la temperatura de cultivo de 37°C a 34°C durante la producción, aumentó la velocidad inicial de acumulación del producto, pero el máximo alcanzado en la actividad específica del antiviral no varió.

SUMMARY

Insertion of a 18 bp oligonucleotide into the PvuII restriction site located in the IFN α 2 gene region that codifies for the prepeptide resulted in a striking increase in the antiviral activity produced by *E. coli* transformed with a recombinant plasmid bearing the IFN α 2 gene down stream of two lac UV5 promoters.

Maximal specific antiviral activity in *E. coli* HB101 host cells was obtained in the middle of the exponential period. After this a marked decrease in the specific activity was observed. When *E. coli* JM101 (an hyperproducer of the lac repressor) was used, maximal activity was observed 1,5 h after the addition of the inducer (IPTG).

Plasmid content per cell was constant during the bacterial growth cycle. When plasmid copy number was amplified by pretreatment with chloramphenicol there was a marked increase in the antiviral activity at the initial steps of the growing cycle. The half life of the antiviral activity in bacterial crude extracts was 75 minutes at 37°C and 165 minutes at 30°C. The lowering of culture temperature from 37°C to 34°C resulted in an increase of the initial rate of synthesis, but the maximal specific antiviral activity recorded was the same.

INTRODUCCION

Los avances realizados en los últimos años en la tecnología de recombinar ADN *in vitro*, han permitido el aislamiento y la expresión en microorganismos de varias proteínas de valor industrial. La optimización de la producción de los organismos recombinantes requiere el estudio de varios parámetros, tales como la influencia del número de copias del gen a expresar por célula, las características genéticas del microorganismo hospedador, los efectos de la velocidad del crecimiento del microorganismo hospedador sobre la expresión genética, etcétera. Fueron descritos algunos modelos a nivel molecular que permitieron realizar predicciones sobre el comportamiento de genes clonados en plásmidos, en especial en cuanto a su expresión genética (Lee y Bailey 1983, 1984 a y b). Sin embargo, existen pocos datos experimentales disponibles para comparar con los resultados de estos modelos de simulación.

En nuestro laboratorio hemos aislado varios genes de interferón alfa y uno de ellos del tipo alfa 2 ha sido expresado (Denoya *et al.*, 1985 y Zorzopulos *et al.*, en preparación). En este trabajo presentamos algunos resultados tendientes a describir el comportamiento de este gen expresado bajo el control del promotor del operon *lac* de *E. coli*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Como hospedador de los plásmidos recombinantes se utilizó normalmente *E. coli* cepa HB 101 y el medio de cultivo utilizado fue *Luria broth*.

Una mutante *lac* I^q de *E. coli* (JM 101) se utilizó como hiperproductor del represor del operon *lac*. La transformación se efectuó de acuerdo con el método de Hanaham (1983). El plásmido de expresión utilizado (pMS 39) posee dos promotores *lac* y fue gentilmente cedido por Marco Soria.

Aislamiento del ADN plasmídico

Para el aislamiento del ADN plasmídico se utilizó el método de Birboim y Doly (1979). Normalmente el ADN extraído se purificó mediante tres extracciones sucesivas con una mezcla

de fenol/cloroformo (1/1), seguido por tres extracciones con éter frío; finalmente el ADN se precipitó con etanol.

Reactivos y enzimas

Todas las endonucleasas utilizadas, así como también la exonucleasa Bal 31, la ligasa de T4, la ADN polimerasa y el IPTG fueron adquiridos en Bethesda Research Laboratories (BRL) y utilizados de acuerdo con las recomendaciones de los vendedores. El oligonucleótido de 23 pares de bases utilizado fue un obsequio de Francisco Baralle.

Sondeo de la biblioteca de genes

La biblioteca de genes fue construida utilizando como vector de clonaje el fago λ (Charon 4A), de acuerdo con el protocolo descrito por Maniatis y cols. (1982). La presencia de genes de IFN se investigó utilizando como sonda el oligonucleótido AAATACTTCCAAAGAATCACT CT, que representa una secuencia común a varios genes de IFN leucocitario.

Construcción de los vectores de expresión

Un fragmento EcoRI proveniente del ADN de un fago λ recombinante, que contenía el gen perteneciente al IFN- α 2 humano de acuerdo con el análisis por restricción, fue recortado en ambos extremos utilizando la enzima Bal 31. Los extremos se repararon utilizando la enzima ADN polimerasa I de *E. coli* (fragmento Klenow), y los fragmentos con un tamaño entre 800 y 1 000 pares de bases se aislaron de un gel de poliacrilamida. Estos fragmentos se insertaron en el sitio Cla I del pBR322 después de reparar los extremos salientes generados por la acción de esta enzima con la ADN polimerasa I de *E. coli* (fragmento Klenow). Los plásmidos híbridos así obtenidos se introdujeron por transformación en *E. coli* HB 101 y las colonias conteniendo secuencias de nucleótidos del gen de IFN se reconocieron mediante la sonda sintética. Uno de los clones positivos (p 69) poseía una inserción de cerca de 900 pares de bases que contenía la secuencia entera del gen de IFN- α 2, de acuerdo con el análisis por restricción. Un fragmento EcoRI-Hind III del p 69, que contenía al gen de IFN, se insertó frente a los dos promotores *lac* presentes en el plásmido MS39. El plásmido resultante pD11 (figura 1) fue capaz de dirigir la síntesis de unas 100 UI de actividad antiviral por ml de cultivo. Esta actividad antiviral se comportó como IFN leucocitario en cuanto a su estabilidad a pH 2, su sensibilidad a distintas proteasas y por ser específicamente neutralizable con suero de cabra anti IFN leucocitario humano. La inserción de un fragmento de ADN de 18 pares de bases en el sitio PvuII localizado en la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido señal (figura 2) resultó en un incremento notable en la producción del antiviral (5 000 UI/ml) (Zorzopulos *et al.*, en preparación). Este plásmido de expresión denominado pG42 se utilizó en la mayor parte de los experimentos aquí presentados.

Ensayo de la actividad de IFN

La actividad antiviral del IFN se ensayó utilizando el método de la reducción del efecto citopático con células de la línea WISH desafiadas con el virus de la estomatitis vesicular (V.S.V.).

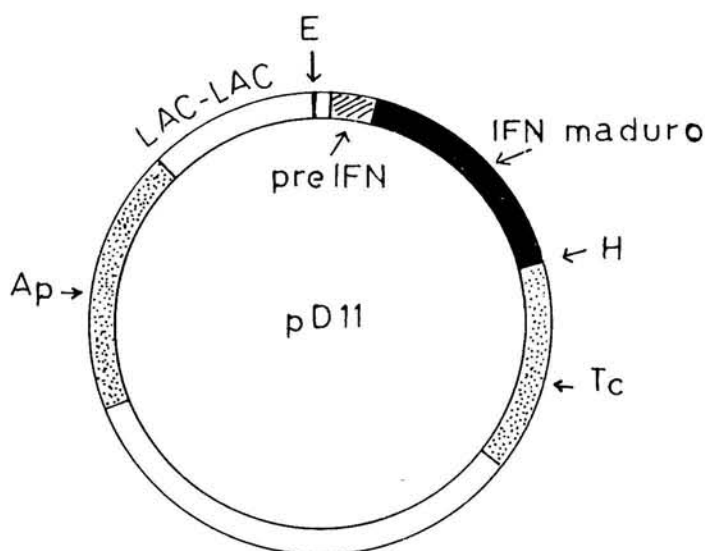


FIG. 1. Plásmido pD11. Este plásmido contiene el gen que codifica el polipéptido preinterferón $\alpha 2$ insertado en forma consecutiva a dos promotores *lac* UV5 de *E. coli*.

Inducción de la actividad antiviral en *E. coli*

Los clones transformados de *E. coli* se crecieron con agitación continua toda la noche a 37°C, utilizando como medio de cultivo caldo L. El inductor IPTG se agregó a diferentes tiempos de acuerdo con el tipo de experimento y su concentración final fue 0,5 mM. Se tomaron muestras del cultivo a diferentes tiempos y se centrifugaron por un minuto en una microcentrífuga. El sedimento de bacterias se resuspendió en P.B.S. (1/5 del volumen de la muestra), se congelaron utilizando una mezcla de etanol y hielo seco como refrigerante. Posteriormente se descongelaron y se sonicaron (4 pulsos de 10 segundos) utilizando un sonicador ultrasónico. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 10 000 x g y la actividad antiviral del sobrenadante se midió como se indicó anteriormente.

RESULTADOS

La inserción de un fragmento de ADN de 18 pares de bases, cuya secuencia se muestra en la figura 2 en el sitio PvuII presente en la región que codifica para el pre péptido del gen de IFN- $\alpha 2$, resulta en un notable incremento en la actividad antiviral producida durante el período de crecimiento del clon recombinante (figura 3). Los motivos de este incremento no son triviales y son objeto de un estudio detallado en nuestro laboratorio. En la figura 3 también puede observarse que la cantidad de producto por masa celular se incrementa sostenidamente hasta pasada la mitad de la fase exponencial, para luego tener una caída pronunciada cuando el cultivo está llegando a la fase estacionaria.

de la bacteria en sus distintos estadios de crecimiento pueden alterar significativamente la cantidad de producto acumulado. En consecuencia, la marcada caída en la actividad antiviral observada al llegar a la fase exponencial, podría ser el resultado del decremento en la velocidad de síntesis, del aumento en la velocidad de degradación o de ambos efectos sumados.

Efecto del tiempo de agregado del inductor sobre la producción del antiviral

Para realizar estudios de la influencia del agregado del inductor a distintos tiempos en la producción del antiviral, el plásmido G42 fue introducido por transformación en *E. coli* cepa JM 101, un hiperproductor del represor del operón *lac*, de manera tal que la síntesis del antiviral fuera totalmente dependiente del agregado del inductor (IPTG). La figura 4 muestra que: a) la forma de la curva de producción es similar, independientemente del tiempo de agregado del inductor, b) el máximo en actividad específica ocurre aproximadamente 1,5 h después de agregado el inductor en todos los casos, y c) que el valor del máximo de la curva es mayor cuando el inductor se agrega de forma tal que este máximo se produzca pasada la mitad de la fase exponencial.

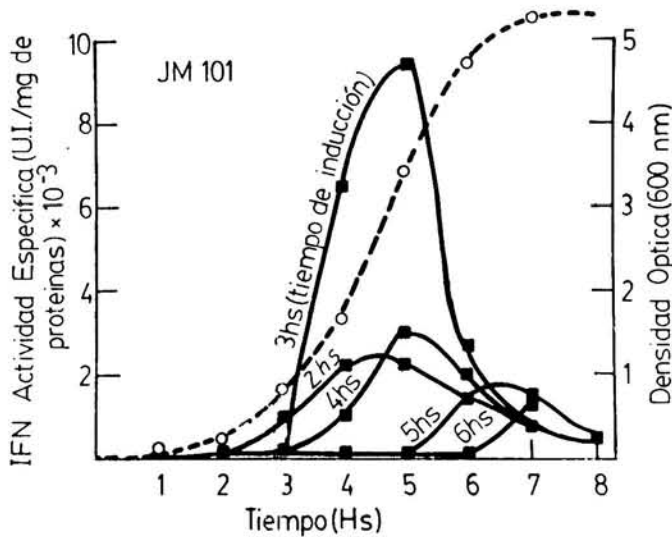


FIG. 4. Efecto del agregado del IPTG a distintos tiempos sobre la producción de IFN recombinante. El clon utilizado en este caso fue *E. coli* JM101 transformado con el plásmido G42.

El agregado de más inductor, una vez comenzada la producción no modifica la forma de la curva (resultados no mostrados). Estos resultados parecen indicar que el agregado del inductor desata una cadena de eventos que llevan a la síntesis del antiviral, pero que a su vez existe una respuesta coordinada del sistema que llevará finalmente a frenar la síntesis del producto recombinante. Por otro lado, la magnitud del máximo alcanzado en cada curva de inducción refuerza la idea de que la velocidad de síntesis se incrementa cuando se incrementa la velocidad de crecimiento de la célula, y viceversa.

La influencia del tiempo del agregado del inductor en la síntesis del producto recombinante es diferente si el plásmido se encuentra en el citoplasma de la *E. coli* cepa HB101, donde la cantidad de represor sintetizado por la célula es insuficiente para titular todas las copias del plásmido. La síntesis constitutiva del antiviral en este clon alcanza el 60 por ciento de la actividad lograda en presencia del inductor (datos no mostrados), y puede observarse en la figura 5 que el agregado del inductor a 0,75 h y a 3,5 h no modifican la magnitud ni la posición del máximo. La cantidad del antiviral sintetizada en las primeras 3,5 h es el doble en las células inducidas con respecto a las no inducidas, pero una vez agregado el inductor estas últimas rápidamente alcanzan el nivel del antiviral acumulado por las células inducidas a 0,75 h de iniciado el cultivo.

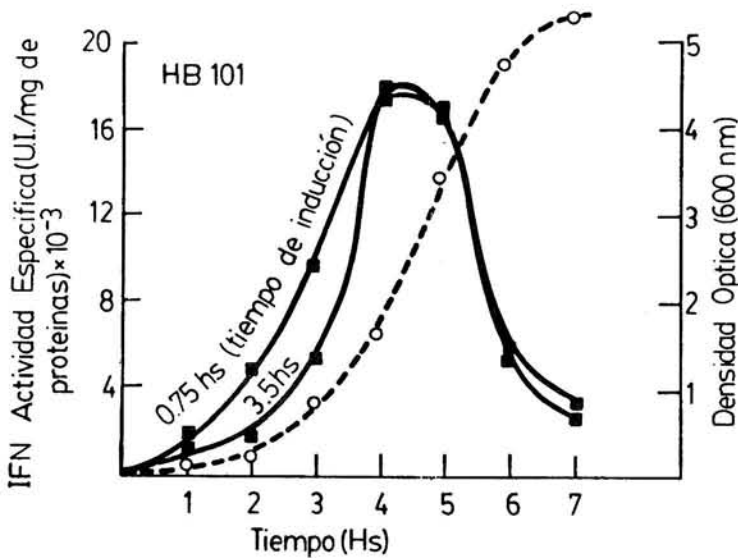


FIG. 5. Efecto del agregado de IPTG a dos tiempos sobre la producción del IFN recombinante. El clon utilizado en este caso fue *E. coli* HB101 transformada con el plásmido G42.

El comportamiento de estas células que presentan un nivel importante de síntesis constitutiva de IFN no es fácilmente interpretable, pero nuevamente sugiere la existencia de un mecanismo de autolimitación en la síntesis del producto recombinante.

Efecto del número de copias del plásmido recombinante por célula en la producción de IFN

En varios trabajos se ha descrito la disminución del número de copias de un determinado plásmido por célula durante el crecimiento de la bacteria (Dwivedi *et al.*, 1982; Kim y Ryu, 1983; Noack *et al.*, 1981; Nordström, 1980; Skagman, 1983; Wouters *et al.*, 1980). También se han descrito alteraciones en la estructura del plásmido, que pueden ocurrir como consecuencia de un desbalance metabólico, producto de la expresión del plásmido recombinante (Rood *et al.*, 1980). Con el objeto de verificar si algunas de estas variantes se producía durante

la fase de crecimiento del clon bacteriano que contiene al pG42, se estudió el contenido plasmídico y su estructura a distintos tiempos. La figura 6 muestra que el contenido del plásmido analizado por extracción y electroforesis, o por hibridación de un idéntico número de células tomadas a distinto tiempo de la fase de crecimiento, no presenta grandes variaciones durante las distintas fases; por otro lado, a juzgar por la movilidad electroforética, tampoco se han producido alteraciones marcadas en la estructura, aunque no puede descartarse la presencia de pequeñas deleciones o inserciones. Esta última posibilidad parece no ser cierta, puesto que un cultivo crecido por 10 h en condiciones de producción y luego diluido 100 veces, repite la misma curva de producción comúnmente observada (resultados no mostrados). Por lo tanto, la disminución brusca en la producción del antiviral al llegar a la fase estacionaria no puede ser atribuida a la disminución en el número de copias del plásmido por bacteria. Este número podría caer si no se mantiene la presión de selección a favor de la mantención del plásmido. Esta presión está ejercida por la presencia de ampicilina durante el crecimiento. La tabla 1 muestra la diferencia en el rendimiento de dos cultivos, uno crecido en presencia y otro en ausencia de ampicilina.

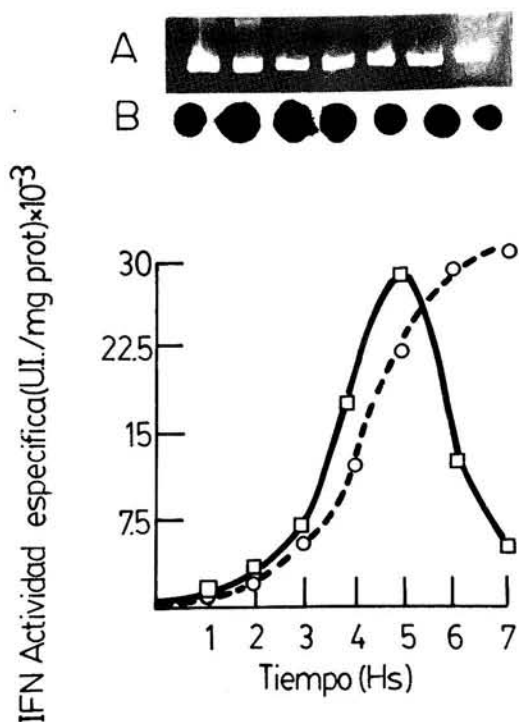


FIG. 6. Contenido plasmídico de un clon recombinante durante el ciclo de crecimiento y producción de IFN recombinante.

Tabla 1

EFECTO DE LA AMPICILINA SOBRE LA PRODUCCION DEL ANTIVIRAL EN *E. COLI* HB101, TRANSFORMADA CON EL pG42

Condiciones de cultivo	Actividad específica (UI/mg de proteína)
+ Amp. (40 µg/ml)	9 000
- Amp.	2 700

La influencia del aumento en el número de copias del plásmido en la producción del antiviral, fue estudiada creciendo el cultivo de bacterias utilizado como iniciador hasta el comienzo de la fase exponencial, en ese momento se agregó cloranfenicol (CAF) (0,17 mg/ml) y se mantuvo el cultivo por 16 h en presencia de la droga. Después, las células fueron lavadas y utilizadas como inóculo. Como control se utilizaron células crecidas hasta el comienzo de la fase exponencial, lavadas y utilizadas como inóculo. La figura 7 muestra que unas dos horas después del agregado del inductor, las células previamente inoculadas con CAF sintetizaron el antiviral en forma muy superior a las células no tratadas. Los niveles de actividad específica fueron aun mayores que los alcanzados por las células control en el máximo producido durante la fase exponencial.

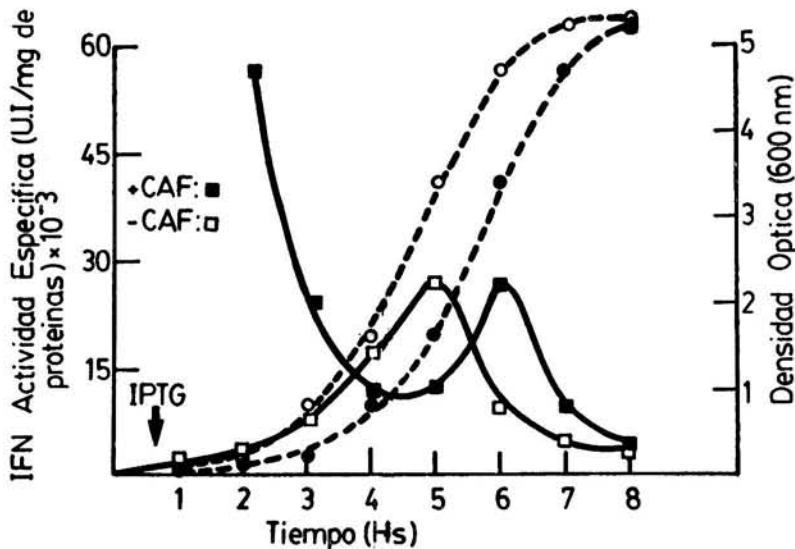


FIG. 7. Efecto de la preincubación con cloranfenicol sobre la producción de IFN recombinante.

Dado que la preincubación incrementa enormemente la cantidad de copias del plásmido por célula (Clewell, 1972) este resultado indica la importancia del número de genes disponibles en los niveles de producción de la proteína recombinante. Por otro lado, es evidente que

durante las primeras horas del crecimiento, se produce una normalización del número de copias del plásmido de manera tal que al llegar a la fase exponencial ambos cultivos fabrican la misma cantidad del producto (el tratamiento previo con CAF desplaza 1 hora la curva de crecimiento y la curva de producción del antiviral).

Estabilidad del IFN α en extractos crudos

La marcada caída en la actividad específica del IFN recombinante llegando a la fase estacionaria, sugiere no solo un descenso en la producción del antiviral, sino la presencia en el citoplasma bacteriano de un sistema capaz de inactivarlo. Talmadge y Gilbert (1982) demostraron que ciertos péptidos recombinantes derivados de la insulina que permanecen en el citoplasma poseen una vida media cercana a los dos minutos *in vivo*. Emerick *et al.* (1984) estudiaron la vida media de proinsulina recombinante en extractos bacterianos y encontraron que tenía un valor de 14 minutos a 37°C y de 21 minutos a 30°C. La figura 8 muestra que la vida media del IFN recombinante aquí descrito es de 75 minutos a 37°C y 165 minutos a 30°C. Este resultado sugirió la posibilidad de lograr mejores niveles de producción disminuyendo la temperatura de incubación durante el crecimiento. Sin embargo, lo que se observó (figura 9) es un corrimiento del máximo hacia etapas más tempranas de la fase exponencial. Este corrimiento en el máximo es de alrededor de una hora, si se baja la temperatura de 37°C a 34°C y no se acompaña con una variación en los valores de la actividad específica del antiviral en dicho máximo. Este resultado sugiere nuevamente la existencia de una reacción del sistema celular a la síntesis del producto que limita la concentración máxima intracelular alcanzable en cada punto de la curva de crecimiento.

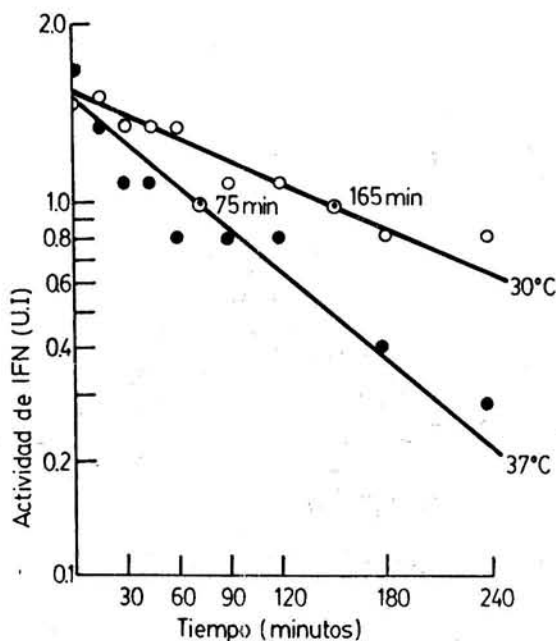


FIG. 8. Velocidad de degradación del IFN recombinante en extractos bacterianos.

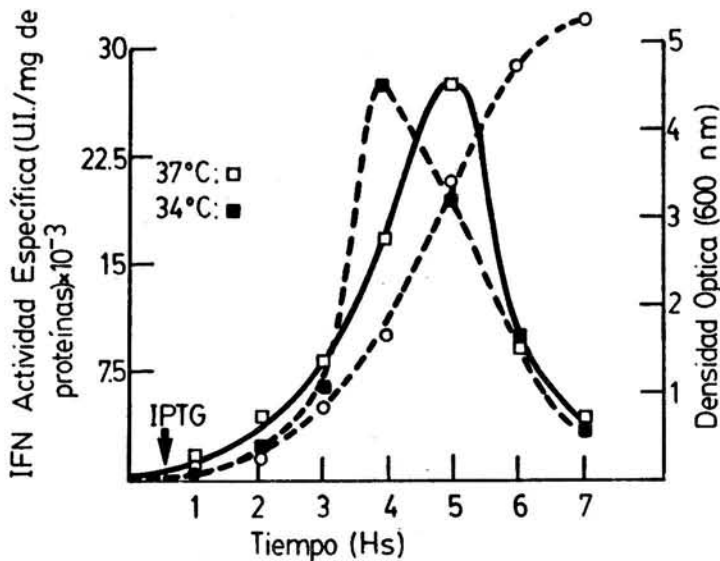


FIG. 9. Curvas de producción de IFN recombinante, a dos temperaturas diferentes.

DISCUSION

Los resultados aquí presentados indican la existencia de dos fases bien definidas en la curva de actividad específica del IFN recombinante descrito en función del tiempo de crecimiento. En la primera fase, la proteína recombinante parece ser sintetizada a una velocidad mayor que el grueso de las proteínas celulares, y por lo tanto, la actividad específica del producto se incrementa en forma aproximadamente exponencial. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la cantidad de producto presente en la célula en cada momento es el resultado de la diferencia entre la velocidad de síntesis y la velocidad de degradación, y solamente si se asume que esta última se constata, es factible inferir una correlación directa entre el incremento de la masa celular y la velocidad de síntesis del producto.

Es muy llamativa la marcada caída en la actividad específica, una vez pasada la mitad de la fase exponencial, dado que en esta porción de la curva el crecimiento comienza a desacelerarse; esta caída parece indicar que efectivamente la velocidad de síntesis del producto depende de la velocidad de crecimiento de la célula y que la degradación es muy rápida, de manera tal que el producto no se acumula. Talmadge y Gilbert (1982) comunicaron una vida media de dos minutos para péptidos recombinantes citoplasmáticos, derivados de la insulina, pero debe tenerse en cuenta que este valor puede tener variaciones importantes para los distintos péptidos recombinantes.

Los experimentos de inducción donde se utiliza como célula hospedadora la *E. coli* JM 101, y la síntesis del producto recombinante depende en forma marcada de la presencia del inductor, señalan que el máximo de actividad específica se produce alrededor de 1,5 h después de agregado el inductor, cualquiera sea el punto de la curva de crecimiento en que este se agregue, lo cual parece indicar que simultáneamente a la iniciación de la síntesis del polipéptido, comienza

a producirse un cambio en la célula que llevará a la limitación de esa síntesis. Algunos de los mecanismos por los cuales esto puede ocurrir son: incremento en la síntesis de algún regulador negativo, decremento en la síntesis de un regulador positivo, incremento en la síntesis o activación del sistema degradador, etcétera. Se descartó la posibilidad de que el inductor sea degradado, porque el reagregado de IPTG una vez iniciada la producción no modifica sustancialmente la forma de la curva (datos no mostrados).

El número de copias del plásmido por célula no presenta variaciones significativas durante las distintas fases de crecimiento, por lo tanto, se descartó la posibilidad que el número de genes disponibles sea el determinante de las variaciones en la actividad específica del producto. Sin embargo, es difícil descartar la existencia de pequeñas modificaciones estructurales en el plásmido. Si esto último fuera cierto, estas modificaciones tendrían que ser reversibles porque el mismo cultivo utilizado para medir la producción de la proteína recombinante, reutilizado como inóculo, genera una curva de producción idéntica a la del cultivo original (datos no mostrados).

La vida media del IFNr en el extracto crudo fue de 75 minutos a 37°C. Este valor es muy distante de los valores observados *in vivo* por Talmadge y Gilbert (1982) para otro tipo de péptidos recombinantes. Es muy difícil decidir si la actividad inactivante observada *in vitro* tiene relación con lo que ocurre en la célula intacta, donde esta actividad puede estar modificada por compartimiento, asociación con otras moléculas, etcétera. El incremento de la vida media cuando el extracto fue incubado a 30°C sugirió la posibilidad de incrementar la producción *in vivo* bajando la temperatura de crecimiento, tal como ha sido descrito para la síntesis de proinsulina recombinante por Emerick *et al.* (1984). Para verificar esta posibilidad, las bacterias recombinantes se crecieron a 37°C y a 34°C, siendo la curva de crecimiento a ambas temperaturas esencialmente igual.

La actividad específica de la proteína recombinante se incrementó más rápidamente a 34°C, pero llegó a un máximo idéntico al alcanzado en el cultivo crecido a 37°C; a temperaturas superiores el decremento en esta actividad fue menos pronunciada que a 37°C. Este resultado parece indicar que, efectivamente, la velocidad de degradación es menor a 34°C, pero que los valores alcanzados en los distintos puntos de la curva de producción no pueden interpretarse meramente en términos de un balance entre síntesis y degradación, sino que otros factores regulatorios intervienen en el control de la acumulación intracelular del producto.

El análisis de resultados como los aquí descritos mediante modelos matemáticos semejantes a los desarrollados por Lee y Bailey (1983, 1984 a y b), podrían aclarar el papel de los distintos sistemas regulatorios celulares en el control de la producción de distintas proteínas recombinantes.

REFERENCIAS

- BIRBOIM, H. C. y J. DOLY (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucl. Acid. Res. 7: 1513-1523.
- CLEWELL, D. B. (1972). *Nature of Col. E1 plasmid replication in Escherichia coli in the presence of chloramphenicol*. J. Bacteriol. 110: 667-670.
- DENOYA, C. D.; A. R. TREVISAN; A. PESCE; M. CRISCUOLO; J. ZORZOPULOS y A. DIAZ (1985). *Producción de un polipéptido con actividad por fusión del gen interferón- α 2 humano al gen lac Z del bacteriófago M13 mp. 8*. Interferón y Biotechnolog. 2: 15-25.
- DWIVEDI, C. P.; T. IMANAKA y S. AIBA (1982). *Instability of Plasmid-Harboring strain of E. coli in continuous culture*. Biotechnol. Bioeng. 24: 1465-1468.
- EMERICK, A. W.; B. L. BERTOLANI; A. BEN-BASSAT; T. J. WHITE; M. W. KONRAD (1984). *Expression of a β -lactamase proinsulin fusion protein in Escherichia coli*. Biotechnol. 2: 165-168.

- HANAHAM, D. (1983). *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J. Mol. Biol. **166**: 557-580.
- KIM, S. H. y D. D. Y. RYU (1983). *Instability Kinetics of trp operon plasmid col. El - trp in recombinant Escherichia coli MV12 (pVH5) and MV12 trp R (pVH5)*. Biotechnol. Bioeng. **26**: 497-502.
- LEE, S. B. y J. E. BAILEY (1983). *Analysis of growth rate effects on productivity of recombinant Escherichia coli populations using molecular mechanism models*. Biotechnol. Bioeng. **26**: 66-73.
- LEE, S. B. y J. E. BAILEY (1984 a). *Genetically structured models for lac Promoter-Operator function in the Escherichia coli chromosome and in multicopy plasmide: lac operator function*. Biotechnol. Bioeng. **26**: 1372-1382.
- MANIATIS, T.; E. F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. pp. 270-293. Cold Spring Harbor Laboratory Publication, New York.
- NOACK, D.; M. ROTH; R. GEUTHER; G. MULLER; K. UNDIRZ; C. HOIFMEIER y S. GASPAR (1981). *Maintenance and Genetic stability of vector plasmids pBR322 and pBR325 in Escherichia coli K12 strain grown in a chemostat*. Mol. Gen. Gent. **184**: 121-124.
- NORDSTRÖM, K.; S. MOLIN y H. AAGAARD-HANSEN (1980). *Partitioning of plasmid R1 in Escherichia coli, I. Kinetics of loss plasmid derivations deleted of the par region*. Plasmid **4**: 215-227.
- ROOD, J. I.; M. K. SNEDDON y J. F. MORRISON (1980). *Instability in tyrR strains of plasmids carrying the tyrosine operon: isolation and characterization of plasmid derivatives with insertions or deletions*. J. Bacteriol. **144**: 552-559.
- SKOGMAN, G.; J. NILSSON y P. GUSTAFSSON (1983). *The use of a partition locus to increase stability of tryptophan-operon bearing plasmids in Escherichia coli*. Gene, **23**: 105-115.
- TALMADGE, K. y W. GILBERT (1982). *Cellular location affects protein stability in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**: 1830-1833.
- WOUTERS, J. T. M.; F. L. DRIEHUIS; P. J. POLACZEK; M. L. H. A. VAN OPPENRAAY y J. G. VAN ANDEL (1980). *Persistence of the pBR322 plasmid in Escherichia coli K12 grown in chemostat cultures*. Antonie van Leeuwenhoek. **46**: 353-362.