

03072

8
2e1.

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**Unidad Académica de los Ciclos Profesionales
y de Posgrado del Colegio de Ciencias y
Humanidades**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**“Regulación de la Expresión de Factores de Virulencia
en *Vibrio cholerae*”.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA:

Biólogo: José Alfredo Morales Pablos

Cuernavaca Morelos

Mayo 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

35332



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



Adquisición letal. Un bacteriófago que porta los genes *ctx* infecta a una bacteria de *V. cholerae*; la cepa resultante produce toxina de cólera y provoca la enfermedad. (Reproducido de Williams N. 1996).

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres

A Dr. David Romero Camarena. (CIFN-UNAM).

Amis Tutores:

Dr. Joaquín Sánchez Castillo. Tutor Principal (INSP-CISEI).

Dr. Carlos Arias Otríz. (IBT-UNAM).

Dr. José Luis Puente García. (IBT-UNAM).

A Dra. Guadalupe Ayala Aguilar. (INSP-CISEI).

Al Dr. Holmgren J. Departamento de Microbiología Médica Universidad de Gothenburgo Suecia, por permitirnos realizar algunos de los experimentos aquí presentados.

A Mis amigos de Suecia Jerónimo Cello, Hamidt Sadegui, Gudrum,

A mis compañeros y amigos del INSP-CISEI.

A mi amigo Candidato a Dr. Raúl Miranda Casoluengo.
Marco Antonio Estrada Peña.

A Pita y a su Mamá.

Al Profesor de Kung Fu Alberto Arellano Romero

Al Escritor Roberto Olivera Unda y compañeros del Taller de Literatura Casa de la Cultura de H. H. Cuautla morelos. Ricardo, Lucha, y Armando

A mis amigos Dr. Armando Frutos Nava, Dr. Jaime Garzón Delgado.

A mis compañeros de Generación. Eduardo, Luis, Blanca, Anabel, Nayeli, Raúl.

A Maria Isabel.

A M.en C. Guillermo Perales Ortíz y Quím. Norma Zambrano Mujica por enseñarme y ayudarme a usar la computadora.

A los Integrantes del Jurado de Exámen:

Dr. Mario Zurita Ortega Presidente

Dr. Joaquín Sánchez Castillo. Secreterio

Dr. Humberto Flores Soto. Vocal

Dra. Gloria Soberón Chavez.

Dr. José Luis Puente García.

INDICE

- Resumen (página 1)
- Introducción (página 3)
- Elemento genético CTX (página 3)
- Figura 1. Representación esquemática del elemento genético CTX. (Página 4)
- Regulación genética. (página 5)
- Figura 2. Modelo para la regulación de factores de virulencia por ToxR/S ToxTen *Vibrio cholerae*. (página 7)
- “Cassette” de virulencia de *V. cholerae*. (página 8)
- Figura 3. Representación esquemática del “cassette” de virulencia de *Vibrio cholerae*. (página 9)
- Bacteriófago CTX ϕ de *V. cholerae*. (página 10)
- Figura 4. Representación esquemática del genoma del bacteriófago CTX ϕ . (página 11)
- Figura 5. a) Comparación por tamaño b) comparación de la secuencia de aminoácidos predicha para *cep* con la secuencia de aminoácidos del gene VIII de los bacteriófagos M13, pfl, e Ifd. (página 13)
- Figura 6. Representación esquemática de la organización modular de los genes del bacteriófago CTX ϕ y M13. (página 14)
- Tabla comparativa de las semejanzas y diferencias entre el bacteriófago CTX ϕ y el bacteriofago M13. (página 15)
- Objetivos. (página 16)
- Hipótesis. (página 16)
- Resultados. (página 17)
- I.- Construcción de las Fusiones Transcripcionales. (página 17)
- Localización de los Sitios de Amplificación. (página 18)
- Secuencias nucleotídicas de las fusiones transcripcionales. (página 19)
- II.- Expresión de CTB bajo el control de las regiones reguladoras potenciales de los genes del “cassette” de virulencia. (página 20)
- Tabla A).- Niveles de expresión de *ctxB* de las fusiones clonadas en pBR325 expresadas en el huésped *E. coli* DH5 α . (página 20)
- Gráfica representativa de titulación de CTB por GM1-ELISA. (página 21)
- Tabla B).- Niveles de expresión de *ctxB* de las fusiones clonadas en pUC19 expresadas en el huésped *E. coli* DH5 α . (página 22)
- Tabla C).- Ausencia de activación de las regiones reguladoras potenciales por el regulador transcripcional ToxR, expresadas en el huésped *E. coli* DH5 α . (página 23)
- Tabla D).- Niveles de expresión de *ctxB* de las fusiones clonadas en pBR325 expresadas en *V. cholerae* JBK70. (página 24)

Tabla E).- Niveles de expresión de *ctxB* de las fusiones clonadas en pUC19 expresadas en *V. cholerae* JBK70. (página 25)

Discusión. (página 26)

Conclusiones. (página 33)

Apéndice. (página 35)

Materiales y Métodos. (página 36)

Tabla 1. Cepas Bacterianas y Plásmidos. (página 42)

Bibliografía citada. (página 45)

RESUMEN

V. cholerae, el agente causal del cólera expresa factores de virulencia que le permiten colonizar el intestino y que son clave para provocar la enfermedad. La toxina de cólera (CT) es considerada el factor de virulencia principal. CT es codificada por el operón *ctxAB*, localizado en el cromosoma de la bacteria. El hallazgo de los genes *cep*, *orfU*, *ace* y *zot*, localizados en la región adyacente al operón *ctxAB*, considerados factores de virulencia adicionales, llevó a la propuesta de la existencia de un "cassette" de virulencia en *V. cholerae*. Para tratar de determinar si la expresión de estos genes adyacentes en el "cassette" está sujeta a regulación genética, se construyeron fusiones transcripcionales. Para ello se seleccionaron zonas de DNA con potencial de ser las regiones reguladoras (R) de los genes *cep*, *orfU* y *zot*, las cuales fueron fusionadas al gene de la subunidad B de la toxina de cólera (*ctxB*). Las regiones R fueron aisladas mediante la técnica de PCR. Los híbridos obtenidos fueron usados para tratar de determinar los niveles de transcripción de los genes *cep*, *orfU* y *zot*, usando como control la región reguladora (P) del operón *ctxAB*. Las fusiones transcripcionales se introdujeron en la cepa *V. cholerae* El Tor JBK70 ($\Delta ctxAB$). Para determinar los niveles de expresión de las fusiones transcripcionales *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB*, *Rzot-ctxB* y *Pctx-ctxB*, se utilizaron condiciones de cultivo AKI-SW, que son consideradas óptimas para la expresión de CT en *V. cholerae* El Tor. Por otro lado, se estudió en *E. coli* el efecto de ToxR, el regulador transcripcional positivo de *ctxAB*, sobre las fusiones transcripcionales por expresión en *trans*. Este regulador pareció no tener efecto positivo y podría tal vez tener efecto negativo sobre la expresión de las regiones reguladoras potenciales clonadas. Ello contrastó con la clara inducción de la expresión del control *Pctx-ctxB*. Las regiones R estudiadas *Rcep-ctxB* y *RorfU-ctxB* se expresaron bien en *E. coli* independientemente del vector de clonación usado. Esto sugiere que las regiones clonadas de *cep* y *orfU* poseen la región promotora natural. Sin embargo, no se observó expresión en *V. cholerae*, lo cual no parece consistente con esta propuesta. Estos resultados podrían explicarse por la existencia de un represor en *V. cholerae*, capaz de inhibir la transcripción de *Rcep-ctxB* y de *RorfU-ctxB* o, por una dependencia en *V. cholerae*, y no en *E. coli*, de su localización cromosomal para su expresión. No obstante, es necesario confirmar estos resultados por otros procedimientos para descartar efectos asociados a la clonación de los genes en vectores recombinantes, así como quizá también a las cepas hospederas empleadas.

Para elucidar si existe un mecanismo de regulación sobre *cep* y *orfU* es probable que se

requiera de realizar fusiones transcripcionales a estos genes directamente en el cromosoma de *V. cholerae*. Lo anterior sustentado en experimentos, incluidos en este trabajo y en reportes de otros investigadores, que apuntan hacia un efecto muy importante de la región de DNA corriente arriba sobre la expresión de los genes del "cassette". También, el descubrimiento, posterior a la realización de este trabajo, de que el "cassette" es en realidad parte del genoma de un bacteriófago filamentoso (CTX ϕ) afectará el diseño de rutas alternas para estudiar la regulación de los genes en cuestión.

INTRODUCCION

V. cholerae, el agente causal del cólera es la especie prototipo de la familia Vibrionacea. Los miembros de este género son: anaerobios facultativos, no forman esporas, bacilos gramnegativos, móviles, curvos o rectos de 1.4 a 2.6 μm de longitud. Por su localización en diferentes habitats se puede proponer que *V. cholerae* se encuentra en tres formas fisiológicas: en un estado latente, libre en ambientes acuáticos y asociado al plancton, como comensal asociado a copépodos y almejas, o bien como patógeno al ingresar por la vía oral y colonizar el intestino delgado en el humano y provocar la enfermedad. Cuando se encuentra en el intestino produce una potente enterotoxina con gran actividad diarreogénica, la toxina de cólera (CT), la cual es considerada el factor de virulencia principal. La toxina CT es codificada por el operón *ctxAB*, localizado en el cromosoma de *V. cholerae* (Mekalanos et al., 1983).

Elemento genético CTX.

La comparación de cepas toxigénicas y no toxigénicas de *V. cholerae*, reveló que cepas conteniendo *ctxAB*, tienen una región constante de aproximadamente 6 kb de DNA en su extremo 5' que no está presente en cepas no toxigénicas (Mekalanos et al., 1983). Esta región, incluyendo *ctxAB* y su secuencia asociada 5', fue llamada el elemento genético CTX (Pearson 1989; Pearson et al., 1993). Se ha encontrado que CTX está duplicado en todas las cepas clásicas examinadas, en contraste solo el 30% de las cepas El Tor presentan dicha duplicación (Mekalanos 1983). Sin embargo, el elemento CTX puede generar varias copias en tandem durante su multiplicación en el intestino y este incremento en número de copias correlaciona con un aumento en la producción de toxina en condiciones de laboratorio (Mekalanos 1983). El elemento genético CTX fue subdividido en dos regiones: una región de 4.6 kb incluyendo *ctxAB*, llamada la región "core" y una región de 2.4 kb llamada RS2 (Goldberg y Mekalanos, 1986; Pearson et al., 1993). Tiene una estructura que recuerda a los transposones compuestos, con una región central de 4.6 kb con los genes *ctxAB*, una región corriente arriba de 2.4 kb llamada RS2 y una o más copias, a ambos lados, de secuencias repetidas (RS1), de 2.7 kb. La estructura final es de 7-9.7 kb (Figura 1)(Mekalanos 1983; Pearson et al., 1993). La secuencia RS1 codifica para un sistema de recombinación específico, el cual permite la integración de un

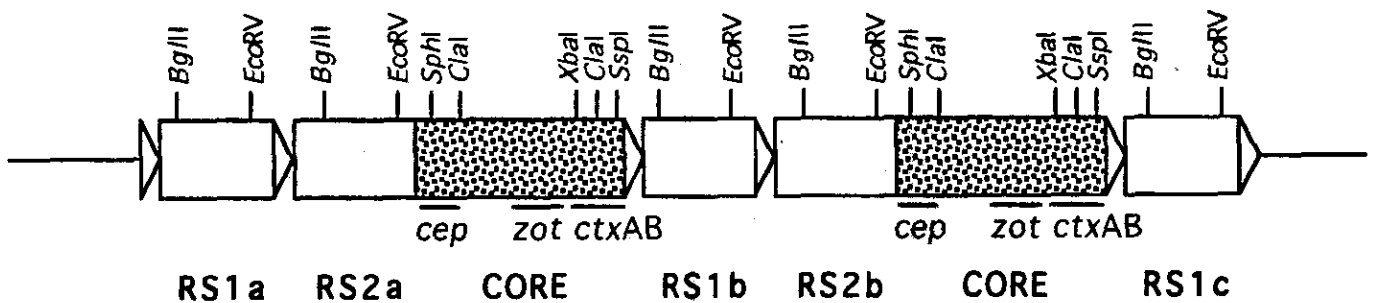


Figura 1. Representación esquemática del elemento genético CTX (duplicado en la cepa *Vibrio cholerae* 01 El Tor E7946) y mapa de restricción. Rectángulos blancos: Región RS1, rectángulos negros: Región RS2, triángulos: End Repeats (ER), línea: DNA cromosomal de *V. cholerae*. (Redibujado de Pearson et. al., 1993).

plásmido suicida, si este lleva 17 pb ("end repeats"). Esta secuencia se encuentra normalmente localizada en los extremos de RS1 y es complementaria a una secuencia de 18 pb (attRS1) localizada en el cromosoma de cepas toxigénicas o no toxigénicas de *V. cholerae*. Por este mecanismo, el cual es independiente de RecA, cepas no toxigénicas, pueden adquirir el elemento genético CTX y volverse toxigénicas (Pearson et al., 1993).

V. cholerae 01 se clasifica en dos biotipos: el biotipo denominado clásico y el biotipo El Tor. Esta clasificación está basada en diferencias fisiológicas tales como: sensibilidad a polimixina B, hemólisis de eritrocitos de carnero, aglutinación de eritrocitos de pollo y la prueba de Voges-Proskauer para acetilmetilcarbinol (Kaper et al., 1995). Ambos biotipos tienen la capacidad de provocar la enfermedad del cólera, pero las cepas clásicas están asociadas con infecciones más graves (Kaper et al., 1995). Por otro lado, las cepas clásicas sintetizan más toxina bajo condiciones comunes de laboratorio que las cepas El Tor (Kaper et al., 1995). En cambio las cepas El Tor requieren condiciones especiales para producir toxina *in vitro*, estas son las llamadas condiciones AKI-SW: medio AKI, a una temperatura de 30°C o de 37°C, pH 7.6 y un periodo estático inicial de 4 hrs en tubo de ensaye (baja aereación) y posterior agitación en matraz (aereación fuerte) al final de la fase exponencial. Bajo estas condiciones, *V. cholerae* El Tor llega a producir hasta 4 µg/ml de CT en el medio de cultivo (Iwanaga et al., 1986).

Regulación Genética.

V. cholerae expresa varios factores de virulencia que le permiten la colonización intestinal y el desarrollo de la enfermedad, entre ellos CT, el pili que se corregula con CT denominado pili TCP (Taylor et al., 1987), que se considera un factor de colonización, proteínas de membrana externa OmpU y OmpT (Miller y Mekalanos 1988) y factores de colonización accesorios (Acf) (Peterson y Mekalanos 1988). Todos estos factores de virulencia están bajo el control de los reguladores transcripcionales ToxR/S y ToxT que operan en cascada. ToxR/S activa la síntesis de ToxT y ToxT activa la síntesis de CT; TcpA, OmpU, OmpT y Acf (DiRita et al., 1991). Además ToxT activa otro grupo de genes que aparentemente no participan en virulencia (Peterson y Mekalanos, 1988), incluyendo el producto del gene *aldA*, el cual codifica para una aldehído deshidrogenasa (Parsot y Mekalanos, 1991). *toxRS* es un

operón con *toxR* proximal al promotor. Ambos *ToxR* y *ToxS* son proteínas periplásmicas que aparentemente se asocian. Corriente arriba del operón *toxRS* y en dirección genética opuesta se localiza el gene *htpG*, el cual codifica para una proteína de choque térmico (*HtpG*). La expresión del operón *toxRS* y del gene *htpG*, es modulada por la respuesta de choque térmico y controlada por el nivel de σ -32 en la célula. Cultivos a 37°C permiten una alta expresión de *htpG* y una baja expresión de *toxRS*, y viceversa, la expresión a 22°C de *hptG* es menor que la de *toxRS* (Parsot y Mekalanos, 1990). La proteína *ToxR* es transmembranal (DiRita y Mekalanos 1991), y se propone que el dominio periplásmico de *ToxR* detecta señales ambientales tales como pH, osmolaridad, temperatura y concentración de ciertos aminoácidos (Miller et al., 1987). La síntesis de CT *in vitro* es dependiente de las condiciones de cultivo. Las condiciones que favorecen la expresión de la toxina en cepas clásicas son: pH inicial de 7.5, temperatura de 30°C, baja osmolaridad y adición de los aminoácidos asparagina, serina, glutámico y arginina (Taylor et al., 1987 ; Miller et al., 1987). Bajo esta condición se ha propuesto que *ToxR* forma un heterodímero con *ToxS*, esta unión modifica *ToxR* y la hace activa (Figura 2)(Miller et al., 1989 ; DiRita et al., 1991). Si *ToxR* se sobreexpresa artificialmente tiende a formar homodímeros y puede funcionar como un activador transcripcional, independiente de *ToxS* (Otteman y Mekalanos, 1996). El dominio citoplásmico de *ToxR* se une a la región promotora de *ctxAB* y *toxT*. Los sitios de unión de *ToxR* en el promotor de *ctxAB* y de *toxT* son poco idénticos en secuencia. En el promotor de *ctxAB*, *ToxR* se une a la secuencia 5' *ttttgat* 3' presente de 3 a 8 veces inmediatamente corriente arriba del promotor de *ctxAB* (Miller et al., 1987). En contraste, la unión de *ToxR* al promotor de *toxT* ocurre en una región rica en adeninas y timinas, con secuencias invertidas repetidas presentes corriente arriba del promotor de *toxT* (Higgins y DiRita, 1994). En *E. coli* el producto del gene *toxR*, clonado en plásmido, incrementa la expresión de la fusión *PctxA-lacZ* integrada al cromosoma por más de cien veces, y complementa mutantes *toxR*, para dar niveles semejantes a una cepa silvestre en *V. cholerae* (Miller et al., 1984). Por su parte el regulador *ToxT*, es una proteína citoplásmica tipo AraC (Higgins et al., 1992) que se une a la región promotora de los genes que activa (Higgins y DiRita, 1994). La explicación a la diferencia observada en la regulación de la expresión de factores de virulencia entre los dos biotipos, está asociada a la manera en que *ToxT* es regulado en cepas El Tor (Medrano et al., 1998 sometido a publicación). Se ha sugerido un papel clave de *ToxT* en cepas El Tor debido a que se puede lograr un alto

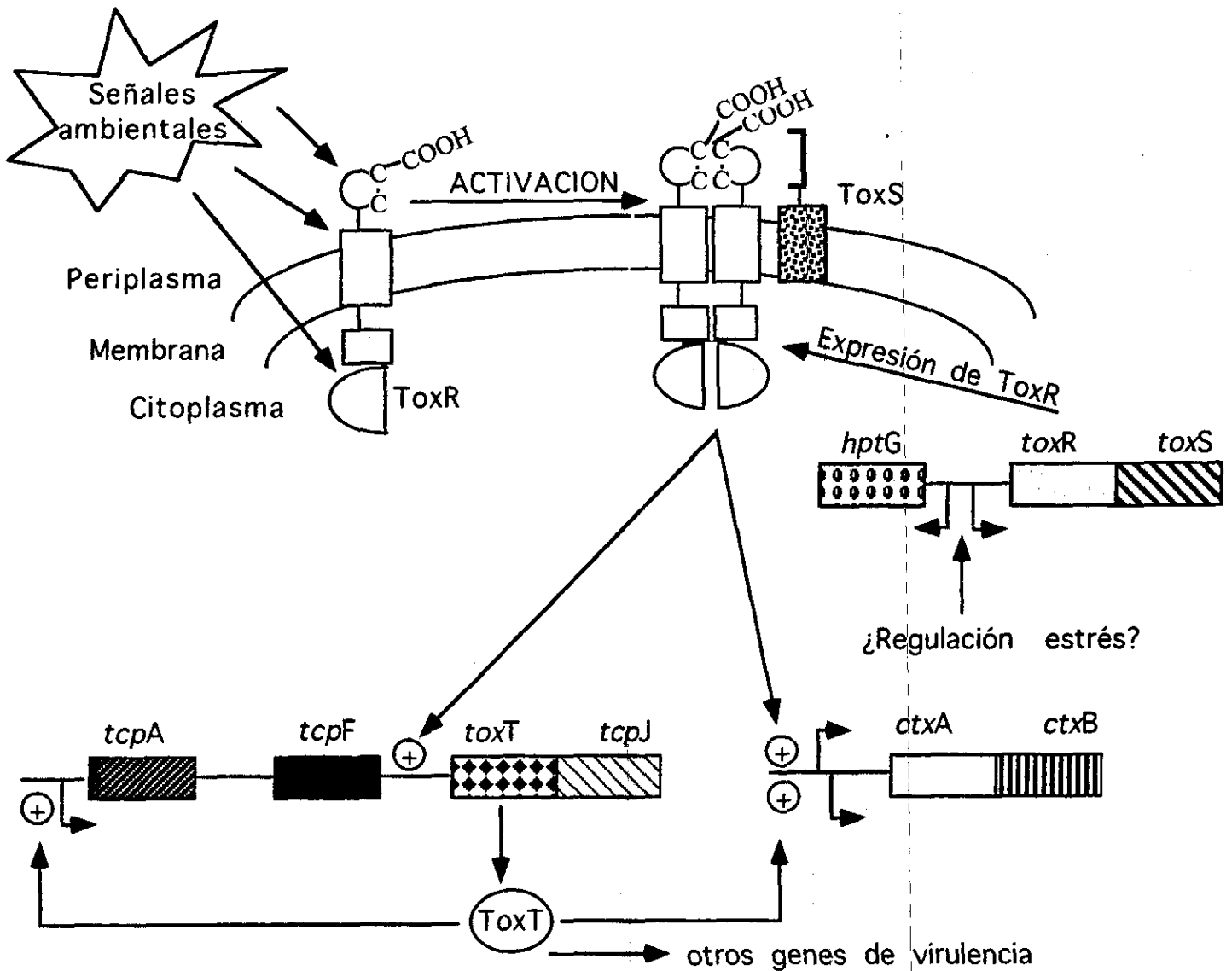


Figura 2. Modelo para la regulación de factores de virulencia por ToxR/S ToxT en *Vibrio cholerae*. La expresión de ToxR/S es regulada por la respuesta a estrés. La proteína ToxR (monómero) detecta señales ambientales y sufre un cambio conformacional (dimerización), el cual es estabilizado por ToxS. En esta forma, ToxR activa la transcripción del operón *ctxAB* y *toxT*. La proteína citoplásmica ToxT activa la transcripción de genes que codifican para factores de virulencia incluyendo *tcp* y *ctxAB*. (Redibujado de DiRita et al., 1991).

nivel de producción de CT y TCP bajo condiciones no permisivas si la expresión de *toxT* se hace independiente del control de ToxR (DiRita et al., 1996).

“Cassette” de virulencia de *V. cholerae*.

La toxina de cólera (CT), está compuesta de dos subunidades: la subunidad A (28 kilodaltons) y la subunidad B (11.6 kilodaltons). La subunidad B media la unión de CT al gangliosido GM₁, presente en la superficie de las células del intestino delgado. Una vez que la toxina se une a la célula intestinal, la subunidad A atraviesa la membrana celular y activa el complejo de la adenilato ciclasa de la célula blanco (Cassel y Pfeuffer, 1978; Gill y Meren, 1978). Se han creado cepas vacunales con deleciones de la subunidad A de la toxina (Kaper et al., 1984; Mekalanos et al., 1983). Cuando estas cepas vacunales fueron probadas en humanos, se encontró que en algunos pacientes aún producían diarrea moderada, dolor de cabeza, dolor abdominal y fiebre en grado bajo (Levine et al., 1988). Debido a que en la región localizada corriente arriba del operón *ctxAB* se identificaron varios marcos abiertos de lectura se propuso que los productos de estos genes podrían ser factores de virulencia adicionales. De hecho, experimentos en animales sugerían la existencia de dos nuevas enterotoxinas en la región corriente arriba. Por lo anterior, se propuso que estas enterotoxinas eran las causantes de la diarrea residual producida por las cepas vacunales que no producían la subunidad A de CT. Las putativas enterotoxinas fueron denominadas Zot “zonula occludens toxin” (Fasano et al., 1991; Baudry et al., 1992) y Ace “accessory cholera enterotoxin” (Truckis et al., 1993). Además de *ace* y *zot* se identificaron otros dos marcos abiertos de lectura; uno cuya secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida no presentaba homología con genes y proteínas conocidos, que fue llamado *orfU* “open reading frame unknown”, y otro que se propuso codificaba un pili. Al gene identificado se le denominó *cep* “core-encoded pilin” (Pearson et al., 1993). Este pili parecía ser importante en la colonización por *V. cholerae* del intestino en conejo. Al conjunto de *cep*, *orfU*, *ace*, *zot* y *ctxAB* se le llamó la región “core”. El elemento genético completo, incluyendo las secuencias RS1 y RS2 fue llamado el “cassette” de virulencia de *V. cholerae* (Figura 3) (Truckis et al., 1993).

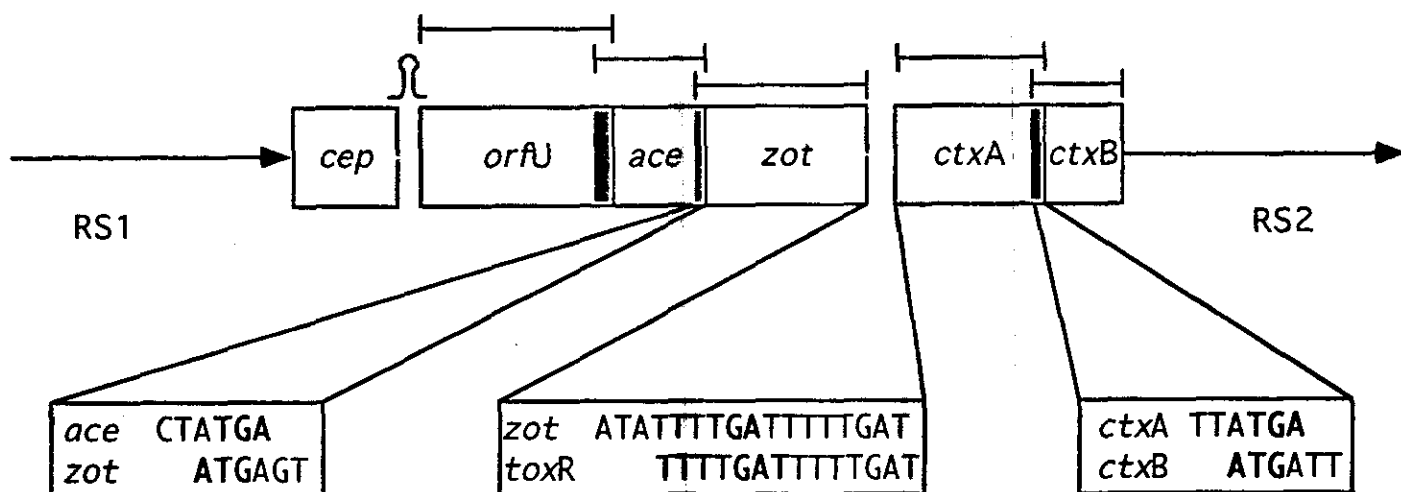


FIGURA 3. Representación esquemática del "cassette" de virulencia de *Vibrio cholerae*. Se muestra el arreglo sobrepuesto de los genes *orfU*-*ace*-*zot*, *ctxAB* y el sitio de unión de ToxR (TTTTGAT) en el final de *zot* (Modificado de Truckis et al., 1993).

Bacteriófago CTX ϕ de *V. cholerae*.

Recientemente fue demostrado que el llamado "cassette" de virulencia forma en realidad parte del genoma de un bacteriófago semejante a los bacteriófagos de la familia M13 que infectan *E. coli* (Waldor y Mekalanos, 1996). El genoma del bacteriófago CTX ϕ (llamado así por tener los genes *ctxAB*), tienen tres regiones: una región de 4.6 kb, la región "core", y una región de 2.4 kb, llamada RS2, y estas están flanqueadas en cada extremo por una secuencia de 2.7 kb, llamada RS1 (Figura 4).

El bacteriófago CTX ϕ está constituido por una cadena sencilla de DNA (la cadena sentido), rodeada por una cápside alargada, y tiene una forma replicativa RF de doble cadena de DNA (ρ CTX ϕ). Para su ingreso a *V. cholerae*, CTX ϕ requiere de unirse al pili TCP (Waldor y Mekalanos, 1996). En virtud del descubrimiento de CTX ϕ puede decirse ahora que el mecanismo, descrito anteriormente, mediante el cual el elemento genético CTX se incorpora al cromosoma es de hecho la forma de integración del bacteriófago. Es decir, el bacteriófago CTX ϕ puede integrarse al cromosoma de manera específica, por un mecanismo independiente de RecA, usando como blanco una región de 18 pares de bases. Se supone que una vez integrado al cromosoma de *V. cholerae*, CTX ϕ se mantiene en una forma lisogénica, sin producir partículas virales. CTX ϕ , sin embargo al igual que otros fagos temperados, es inducido por mitomicina C (Waldor y Mekalanos, 1996).

Reiterando, de acuerdo con información reciente, los genes *cep*, *orfU*, *ace*, *zot* y *ctxAB* son en realidad parte del genoma del bacteriófago CTX ϕ . Si se asume que CTX ϕ tiene la misma estructura que otros bacteriófagos filamentosos, se puede proponer que la información genética para la síntesis de la toxina de cólera estaría como una región no esencial. No se sabe a ciencia cierta aún la función de las proteínas Cep, OrfU, Ace, y Zot, en la estructura y/o función del bacteriófago CTX ϕ , pero mutaciones independientes en *orfU* y *zot* no permiten la formación de bacteriófagos. Por ello, los genes *orfU* y *zot* han sido consideradas indispensables en morfogénesis (Waldor y Mekalanos, 1996). En contraste, y de acuerdo con la propuesta de su condición no esencial, mutaciones introducidas en *ctxAB*, no son deletéreas para la formación del bacteriófago CTX ϕ (Waldor y Mekalanos, 1996).

El análisis comparativo entre el tamaño, organización física y secuencia de aminoácidos

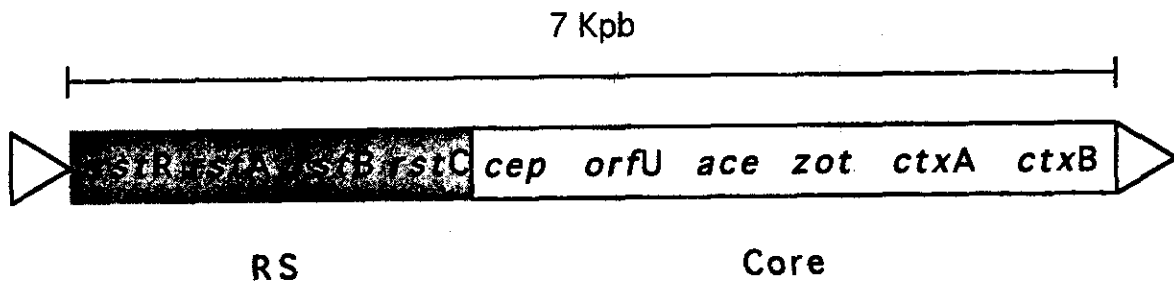


Figura 4. Representación esquemática del genoma del bacteriófago CTX ϕ . El rectángulo en negro indica la región RS2, el rectángulo en blanco indica la región "core", los triángulos en los extremos indican regiones repetidas. (Redibujado de Waldor et al., 1996).

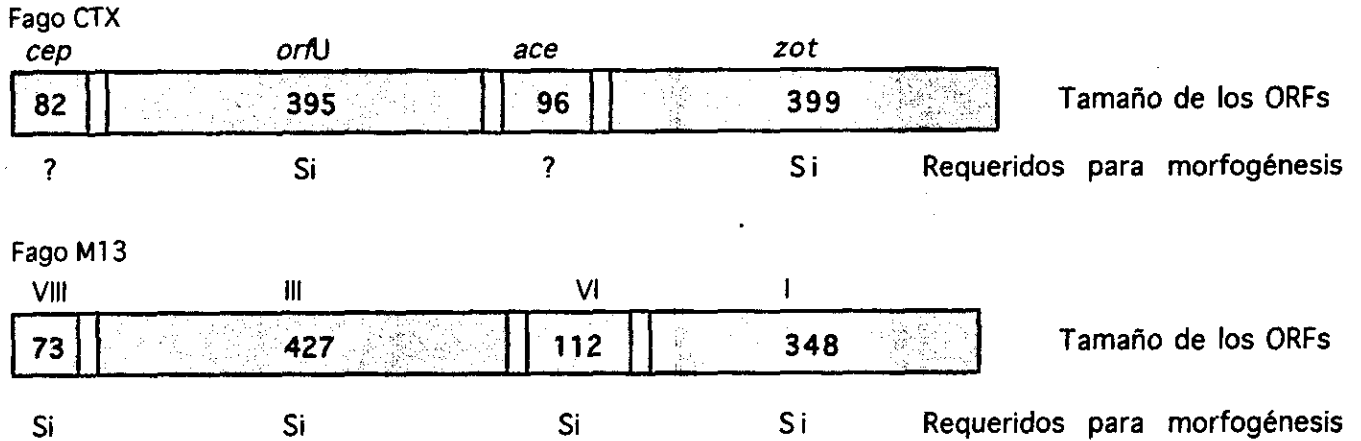
deducida para los genes *cep*, *orfU*, *ace*, y *zot*, y aquella de los genes de bacteriófagos de la familia M13 y fagos relacionados llevó a la propuesta de que *cep* es el equivalente al gene VIII en M13, *orfU* al gene III, *ace* al gene VI y *zot* al gene I (Figura 5 a y b) (Waldor y Mekalanos, 1996). Cabe señalar que las proteínas codificadas por estos genes tienen débil similitud con sus equivalentes propuestos. No obstante, debe también indicarse que la homología entre las proteínas que integran a los propios miembros de la familia M13 no es fuerte tampoco. Una característica que podría apoyar la propuesta de que *cep* es el equivalente al gene VIII y *orfU* al gene III, es la presencia de una región intergénica y un terminador Rho-independiente entre *cep* y *orfU*. Este mismo arreglo existe entre el gene VIII y el gene III de M13 (Van Wezenbeek et al 1980).

Recientemente fueron secuenciadas las regiones RS1 y RS2 de CTX ϕ , ambas son muy semejantes a nivel de secuencia, RS2 contiene los genes *rstR2*, *rstA2* y *rstB2*, la región RS1 contiene *rstR1*, *rstA1* y *rstB1*, además de un gene adicional, *rstC1*. Por medio de un análisis funcional, se identificó que RstA2 es requerida para la replicación y tal vez para la integración; RstB2 es requerida para la integración; y RstR2 es un regulador transcripcional negativo de la expresión de *rstA2* y tal vez de algunos de los genes de la región "core". La función de RstC es desconocida (Waldor et al., 1997).

Como otros fagos filamentosos, el genoma del bacteriófago CTX ϕ , presenta una organización modular, en el cual genes con actividades relacionadas están agrupados: un grupo de genes requeridos para replicación, seguido por un grupo de genes requeridos para morfogénesis, seguido por una región intergénica (Figura 6) (Waldor et al., 1997).

Diferencias importantes entre los genomas de CTX ϕ y M13 son: 1.- CTX ϕ , parece no poseer algunos de los genes cuyos productos son críticos para la morfogénesis en M13 (homólogos de los genes IV y IX). Sin embargo, existe un homólogo del gene IV, *epsD*, en el cromosoma de *V. cholerae*, surgiendo la posibilidad que CTX ϕ requiera EpsD para su morfogénesis; 2.- Las proteínas RstA2 y RstB2, no son homólogas con las proteínas requeridas para replicación e integración en M13; 3.- El gene *rstR*, de CTX ϕ codifica para un regulador transcripcional negativo, en cambio, el gene V, en M13 codifica para un regulador traduccional (Tabla comparativa) (Waldor et al., 1997).

a



b

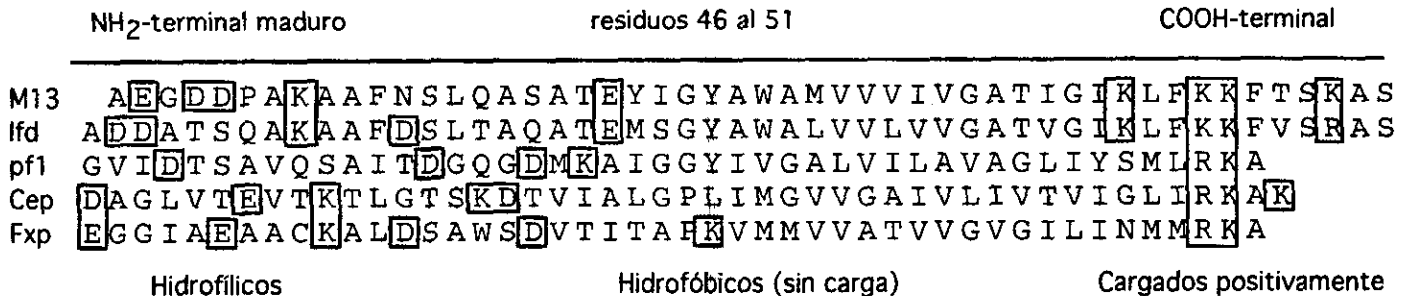


Figura 5. a) Comparación por tamaño y arreglo de los genes *cep*, *orfU*, *ace* y *zot* con los genes VIII, III, VI y I del bacteriófago M13. b) Comparación de la secuencia de aminoácidos predicha para Cep con la secuencia de aminoácidos del gene VIII de los bacteriófagos M13, pf1 e lfd (Redibujado de Waldor et al., 1996).

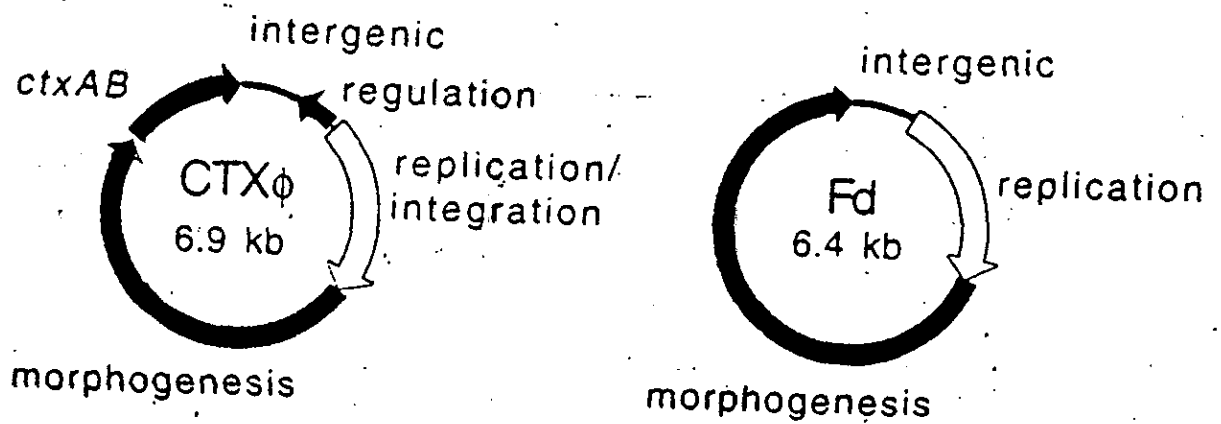


Figura 6. Representación esquemática de la organización modular de los genes del bacteriófago CTX ϕ y M13. (Reproducido de Waldor et al., 1997).

**TABLA COMPARATIVA DE LAS SEMEJANZAS Y
DIFERENCIAS
ENTRE EL BACTERIOFAGO CTX ϕ Y M13**

BACTERIOFAGO M13	BACTERIOFAGO CTXϕ
Cepa susceptible : <i>E. coli</i> (F+)	Cepa susceptible : <i>V. cholerae</i> TCP (+)
Pili conjugativo	Pili no conjugativo TCP
DNA de una cadena (+)	DNA de una cadena (+)
Forma replicativa doble cadena	Forma replicativa doble cadena
No se conocen formas integradas al cromosoma	Integrado al cromosoma (attRS1)
No líticos	No líticos
10 genes	Se proponen 9 genes
Organización genómica modular	Organización genómica modular
Terminador Rho-independiente entre el gene VIII y el gene III	Terminador Rho-independiente entre <i>cep</i> y <i>orfU</i>
Cápside alargada	Cápside alargada
pVIII 2 800 copias	pCep (?)
pVIII 3 copias	pOrfU (?)
Virulencia (?)	Virulencia
	gene <i>cep</i> (core encode pilin ?)
	gene <i>ace</i> (accessory cholera enterotoxin ?)
	gene <i>zot</i> (zonula occludens toxin ?)
	operón <i>ctxAB</i> (cholera toxin) (factor de virulencia demostrado)
Retardamiento celular	Capacidad de colonización ?
No se conoce regulación genética por reguladores de <i>E. coli</i> .	<i>ctxAB</i> regulados por ToxR/S ToxT codificados por <i>V. cholerae</i> .
pV regulador traduccional maestro de los genes I, II, III, IX y V	RstR regulador transcripcional negativo de <i>rstA</i> , <i>cep</i> (?) <i>orfU</i> (?) <i>ace</i> (?) <i>zot</i> (?)
Lisogenia inducida por agentes que dañan DNA.	Lisogénia inducida por agentes que dañan DNA.
	No se han encontrado los genes equivalentes a IV y IX de M13.
	RstA2 y RstB2 no homologas a proteínas equivalentes en M13

OBJETIVOS

- Determinar si los genes *cep*, *orfU* y *zot*, del llamado "cassette" de virulencia de *V. cholerae*, tienen promotores independientes a partir de los cuales se controla su transcripción.
- Determinar si condiciones de cultivo que inducen la síntesis de la toxina de cólera controlan también la expresión de estos genes.
- Determinar si son regulados por ToxR, o si están sujetos a otros mecanismos reguladores, no dependientes de ToxR.

HIPOTESIS

Para lograr una infección exitosa los genes de virulencia adyacentes a *ctxAB* (*cep*, *orfU* y *zot*) en *V. cholerae* El Tor podrían ser regulados a nivel transcripcional y que dicha regulación podría estar estrechamente asociada con aquella de *ctxAB* por constituir, junto con este operón, una unidad genética.

OBJETIVOS

- Determinar si los genes *cep*, *orfU* y *zot*, del llamado "cassette" de virulencia de *V. cholerae*, tienen promotores independientes a partir de los cuales se controla su transcripción.
- Determinar si condiciones de cultivo que inducen la síntesis de la toxina de cólera controlan también la expresión de estos genes.
- Determinar si son regulados por ToxR, o si están sujetos a otros mecanismos reguladores, no dependientes de ToxR.

HIPOTESIS

Para lograr una infección exitosa los genes de virulencia adyacentes a *ctxAB* (*cep*, *orfU* y *zot*) en *V. cholerae* El Tor podrían ser regulados a nivel transcripcional y que dicha regulación podría estar estrechamente asociada con aquella de *ctxAB* por constituir, junto con este operón, una unidad genética.

RESULTADOS

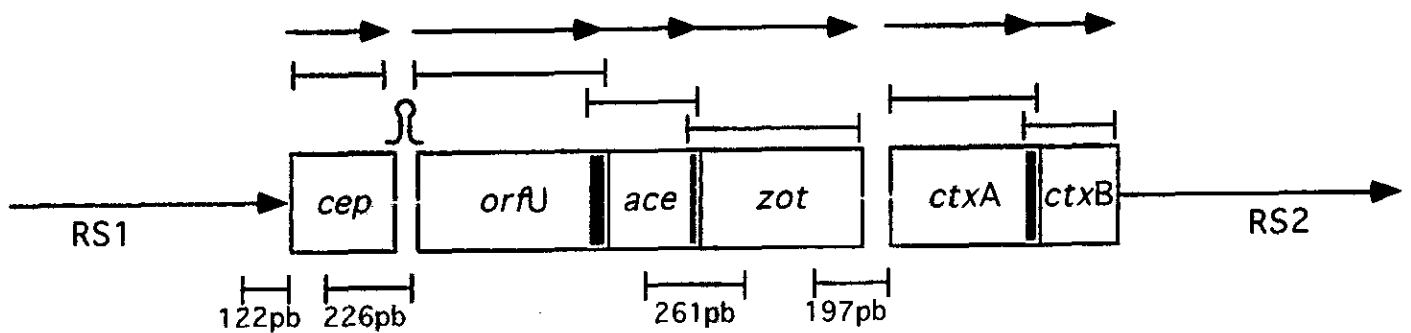
I.-Construcción de las fusiones transcripcionales entre las regiones reguladoras potenciales de los genes del "cassette" de virulencia de *V. cholerae* y el gene reportero *ctxB*.

El gene *ctxB* usado como reportero en nuestro estudio, es un gene recombinante el cual contiene la secuencia para el sitio de unión a ribosoma y la secuencia codificante para el péptido líder de LTB (toxina termolábil de *E. coli*), fusionadas a la secuencia que codifica para la subunidad CTB. El fragmento que contiene el gene *ctxB*, es derivado de DNA cromosomal de la cepa *V.cholerae* 0395 clásica Ogawa, incluye además del gene *ctxB*, 735 pb que son el extremo 3' del "cassette" de virulencia (Sánchez y Holmgren, 1989).

El gene reportero *ctxB*, fue subclonado del plásmido pJS752-3 (Sánchez et al., 1990), al plásmido pBR325 (Bolivar F. et al 1977) en los sitios de restricción *EcoRI-HindIII*, generando el plásmido pBR325 ∇ *ctxB*. Esta inserción aún permitió la expresión del gene para resistencia a tetraciclina.

Para construir las fusiones transcripcionales, las regiones reguladoras potenciales de *cep*, *orfU*, *zot* y la región promotora de *ctxAB*, generadas por medio de la técnica de PCR, fueron clonadas al plásmido pBR325 ∇ *ctxB*, en los sitios de restricción *PstI-EcoRI*. Estas fusiones fueron posteriormente subclonadas al vector pUC19 en los sitios de restricción *PstI-HindIII*.

El gene *toxR*, fue amplificado por medio de la técnica de PCR usando como templado DNA cromosomal de la cepa *V. cholerae* JBK70 El Tor. El gene *ToxR* se colocó bajo el control del promotor *tac* en el plásmido pMMB66 en los sitios de restricción *PstI-HindIII*.



Localización y tamaño de los productos de amplificación por PCR que potencialmente contienen las regiones reguladoras de los genes del "cassette" de virulencia de *Vibrio cholerae*. En la parte superior se indica la posición de un terminador Rho-independiente, el solapamiento de los genes y el sentido de la transcripción.

a).- Fusión transcripcional de *ctxB* a la región 5' del gene *cep*.

*Pst*I
CTGCAGCTTAACCCATTATGTCTGGAACGAGGCGCTCTATTTTCGCG
-35 Promotor
GTGGTCAAGGCCGTTCTCGTTCTGTTCTTTACAT**CTTTTGGG**ATTG propuesto
-10 S/D(*ctxB*) inicio-*ctxB*
GCGCGGTTGCTAG**TCTCATT**TTTATCCACGGTAAAG**Gaattc**gggatgaatt**ATG**
*Eco*RI

b).- Fusión transcripcional de *ctxB* a la región 5' del gene *orfU*.

*Pst*I
CTGCAGATGCGGGTTTGGTCACGGAAGTCACCAAACACTGGGCACCCAGTA
AAGATACGGTGATTGTGCTTGGGCCGCTCATCATGGGCGTGGTGGGGCCAA
-35 -10 final-*cep* Promotor
TTGTTCTGATTGTTACCGTGATTGGCT**TAAATTCGTA**AGGCTAAATAGTGCTT propuesto
GAGTTGTGGCTGGGTCTCTTTGGCTCAGCGGTCATCATTATCGGCTTTGTG
S/D(*ctxB*) inicio-*ctxB*
TCGGGCTTATATTTGGTTTAA**Gaattc**gggatgaatt**ATG**
*Eco*RI

c).- Fusión transcripcional de *ctxB* a la región 5' del gene *zot*.

*Pst*I
CTGCAGCGGTATTATGTGGATTGAGAGAGCAAGATTTTTGTTATCC
AATTCTTCTGGGAGATGTCCAGAAAGTGATTGATATGTTTACCATCTATCC
GCTTATCCAACAGGCTATCGATATGCTGCCTCCTCAATACAGCGGCTTTCT
-35 -10 Promotor
GTTCTTT**TAGGG**TTAGACCAAGCGCTGGCT**TATCGT**GCTTCAGGCTTTGAT propuesto
S/D(*zot*) inicio-*zot* (Baudry et
GACCCGTTTTGCCCTGC**gag**CGTTAAACCT**ATG**AGTATCTTTATTCATCAC al., 1992)
S/D(*ctxB*) inicio-*ctxB*
GGCGGCCAGGC**Gaattc**gggatggaatt**ATG**
*Eco*RI

d).- Fusión transcripcional de *ctxB* a la región promotora del cistron *ctxA* demostrado

*Pst*I
CAAGCG**CTGCAG**GTAGAAGTGAACGGGTTTACCGATAAAAACAGAAAAT
-35 final-*zot* -10 Promotor
GATAAAAAGGACTAAAT**AGTATATTTGATTTTTGATTTTTGATTTTTGATTTTTGA** demostrado
TTTTTGATTTTTGATTTTTGATTTTTGATTTCAATAATAACAAATTTATTTA (Mekalanos et
TTCATTATTTAATTGTTTTGATCAATTATTTTTCTGTTAAACAAAG**Gaattc** al., 1983)
S/D(*ctxB*) inicio-*ctxB* *Eco*RI
gggatgaatt**ATG**

Cursivas en negritas Sitios de Restricción

Minúsculas fusión transcripcional

Minúsculas en negritas S/D

Mayúsculas en negritas -35 -10, Inicio y final del gene.

II.- Expresión de *ctxB* bajo el control de las regiones reguladoras potenciales de los genes del "cassette" de virulencia.

Tabla A).- Niveles de expresión de *ctxB* por: *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB*, *Rzot-ctxB* y *Pctx-ctxB* en *E. coli* DH5 α .

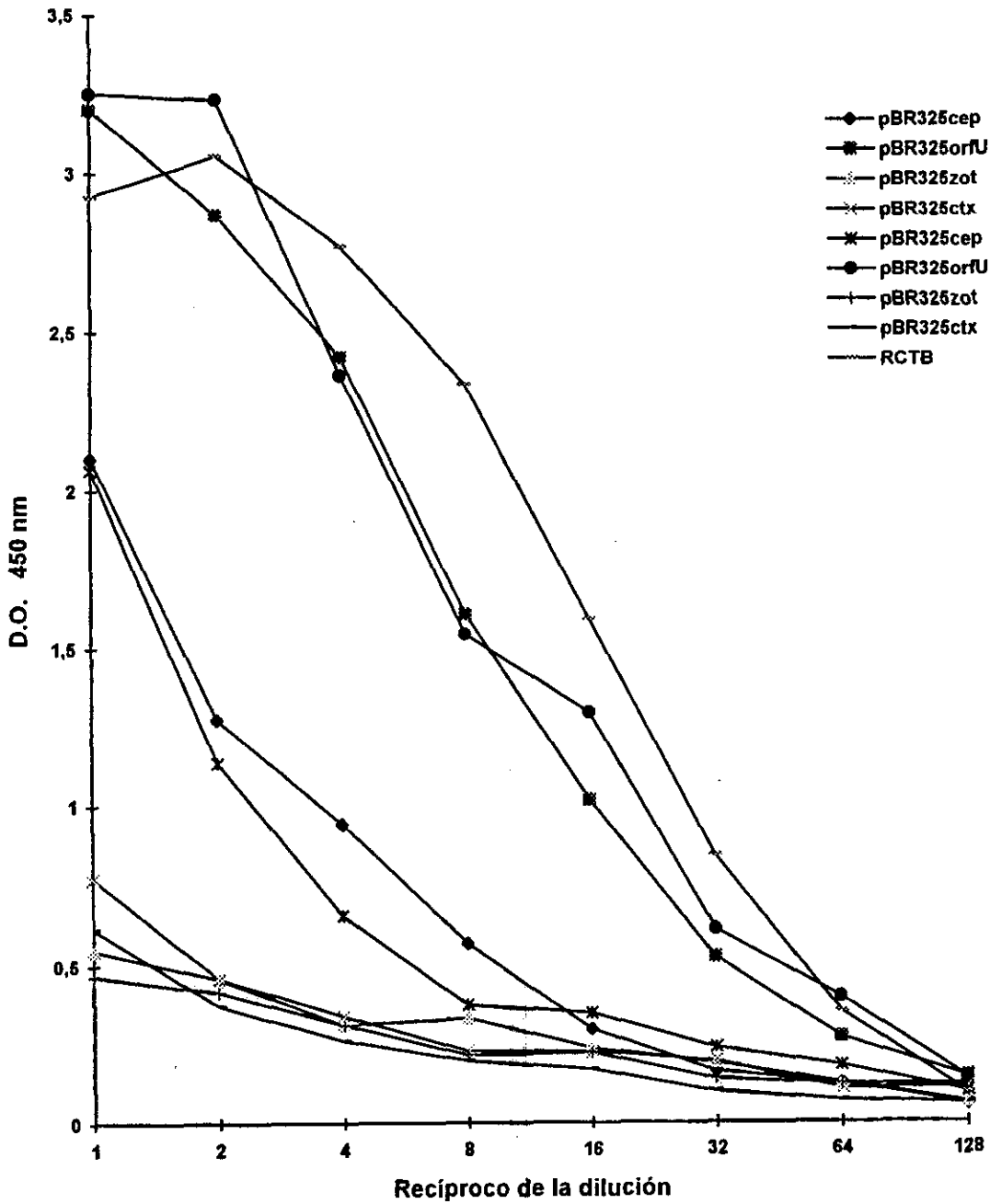
Expresión usando pBR325 como vector

Construcción	Concentración de CTB determinada por GM1-ELISA
<i>Rcep-ctxB</i>	$\Sigma=$ 46 ng/ml.
<i>RorfU-ctxB</i>	$\Sigma=$ 259 ng/ml.
<i>Rzot-ctxB</i>	$\Sigma=$ 15 ng/ml.
<i>Pctx-ctxB</i>	$\Sigma=$ 15 ng/ml.
pCVD15(cassett) <i>ctx-ctxB</i>	$\Sigma=$ 15 ng/ml.
DH5 α	$\Sigma=$ 0 ng/ml.

Los cultivos se crecieron toda la noche a 37°C con agitación continua. Los niveles de expresión de *RorfU-ctxB* y *Rcep-ctxB* sugieren que las zonas clonadas incluyen la región promotora. De la misma manera que otros investigadores observamos que el promotor de *ctxAB* se expresa débilmente en *E. coli*, presumiblemente por la ausencia de ToxR. De manera análoga a *ctxAB* se podría proponer que la baja expresión de *Rzot-ctxB* se debe a la ausencia de un activador; o bien que esta no posee un promotor propio.

Nótese que en *E. coli* no hay aparentemente diferencia en el nivel de expresión entre la fusión *Pctx-ctxB* y *ctx-ctxAB* como parte del "cassette" (plásmido pCVD15).

Gráfica representativa de titulación de CTB por GM1-ELISA.
E. coli DH5



Células de *E. coli* DH5 α , transformadas con cada una de las fusiones transcripcionales: *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB*, *Rzot-ctxB* y *Pctx-ctxB* clonadas en el plásmido pBR325, fueron crecidas toda la noche a 37°C. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de GM1-ELISA.

Tabla B).- Niveles de expresión de *ctxB* por: *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB*, *Rzot-ctxB* y *Pctx-ctxB* en *E. coli* DH5 α .

Expresión usando pUC19 como vector

Construcción	Concentración de CTB determinada por GM1-ELISA
<i>Rcep-ctxB</i>	$\Sigma= 365$ ng/ml.
<i>RorfU-ctxB</i>	$\Sigma= 465$ ng/ml.
<i>Rzot-ctxB</i>	$\Sigma= 207$ ng/ml.
<i>Pctx-ctxB</i>	$\Sigma= 220$ ng/ml
DH5 α	$\Sigma= 0$ ng/ml

Los cultivos se crecieron toda la noche a 37°C con agitación continua. La expresión relativamente más alta de las diferentes fusiones transcripcionales, si se les compara con aquellas en pBR325, sugiere un efecto nivelador debido al vector de clonación (número de copias o un promotor fortuito).

Es notorio, sin embargo, que al igual que lo observado para las fusiones en pBR325, la fusión *RorfU-ctxB* presentó la mayor actividad, seguida de *Rcep-ctxB*, lo cual sugeriría que estas zonas clonadas si incluyen un promotor propio.

Tabla C).- Ausencia de activación de las regiones reguladoras potenciales por el regulador transcripcional ToxR, expresadas en el huésped *E. coli* DH5 α .

Expresión usando pBR325 como vector

Construcción	Concentración de CTB determinada por GM1-ELISA	
	S/IPTG	IPTG
<i>Rcep-ctxB</i> pALFtoxB	menor a 9 ng/ml	menor a 9 ng/ml
<i>RorfU-ctxB</i> pALFtoxB	9 ng/ml	9 ng/ml
<i>Rzot-ctxB</i> pALFtoxB	menor a 9 ng/ml	menor a 9 ng/ml
<i>Pctx-ctxB</i> pALFtoxB	12 ng/ml	220 ng/ml (18.3 veces)
DH5 α	0 ng/ml	0 ng/ml

Los cultivos se crecieron a 37°C con agitación continua. La inducción con IPTG, para sobreexpresar ToxR, se realizó cuando el cultivo había alcanzado una D.O600 nm de 0.5, el experimento se finalizó 3 horas después. Las fusiones *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB* y *Rzot-ctxB* no fueron inducidas por el activador transcripcional ToxR.

Como se esperaba, la fusión *Pctx-ctxB* sí fue activada. Dando un valor de 18.3 veces más comparada con su control. Los niveles tan inferiores a aquellos en ausencia del plásmido pALFtoxB (Tabla A) podrían deberse a que en este experimento los cultivos no fueron de 18 horas sino de 3 horas. Alternativamente, podría haber un efecto negativo en la transcripción por el plásmido mismo, o bien un efecto represor muy fuerte por ToxR. La producción de ToxR en bajas cantidades (insuficientes para inducir *ctxAB*) podría deberse a expresión de "escape" por promotor tac.

Tabla D).- Niveles de expresión de *ctxB* por: *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB*, *Rzot-ctxB* y *Pctx-ctxB* en *V. cholerae* JBK70.

Expresión usando pBR325

Construcción	Concentración de CTB determinada por GM1-ELISA	
	AKI-SW	no AKI-SW
<i>Rcep-ctxB</i>	negativo	negativo
<i>RorfU-ctxB</i>	negativo	negativo
<i>Rzot-ctxB</i>	negativo	negativo
<i>Pctx-ctxB</i>	10 ng/ml	10 ng/ml
pCVD15 (cassette)	196 ng/ml (13 veces)	112 ng/ml (7.5 veces)
<i>V. cholerae</i> JBK70	0 ng/ml	0 ng/ml
<i>V. cholerae</i> silvestre El Tor	4 000 ng/ml	500 ng/ml

Los cultivos se crecieron toda la noche a 37°C, bajo condiciones que favorecen la expresión de toxina en cepas El Tor (condiciones AKI-SW), y bajo condiciones no permisivas (condiciones no AKI-SW). Se observó que las fusiones *RorfU-ctxB* y *Rcep-ctxB*, cuya expresión fue positiva en *E. coli*, se tornó negativa, en *V. cholerae*.

Con base en estos resultados se podría proponer la existencia de un regulador negativo en *V. cholerae*. La fusión *Pctx-ctxB*, en contra de lo esperado, no incrementó su actividad en *V. cholerae*, ni aún en la condición AKI-SW. El promotor de *ctx* en el plásmido pCVD15 ("cassette"), si incrementó su actividad en *V. cholerae*, bajo las dos condiciones de cultivo, con un incremento ligeramente mayor bajo la condición AKI-SW.

Tabla E).- Niveles de expresión de *ctxB* por: *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB*, *Rzot-ctxB* y *Pctx-ctxB* en *V. cholerae* JBK70.

Expresión usando pUC19 como vector

Construcción	Concentración de CTB determinada por GM1-ELISA	
	AKI-SW	no AKI-SW
<i>Rcep-ctxB</i>	negativo	negativo
<i>RorfU-ctxB</i>	negativo	negativo
<i>Rzot-ctxB</i>	negativo	negativo
<i>Pctx-ctxB</i>	94 ng/ml (-2.3)	48 ng/ml (-4.5)
<i>V. cholerae</i> JBK70	0 ng/ml	0 ng/ml
<i>V. cholerae</i> silvestre El Tor	4 000 ng/ml	500 ng/ml

Los cultivos se crecieron toda la noche a 37°C bajo condiciones que favorecen la expresión de toxina en cepas El Tor (condiciones AKI-SW) y bajo condiciones no permisivas (condiciones no AKI-SW). Se observó el mismo fenómeno, no expresión de las fusiones *RorfU-ctxB*, *Rcep-ctxB* y *Rzot-ctxB*, cuya expresión fue positiva en *E. coli*.

En contra de lo esperado la fusión *Pctx-ctxB* disminuyó su expresión en *V. cholerae*, bajo las condiciones de cultivo, con un efecto negativo mayor, bajo la condición no AKI-SW.

DISCUSION

Para monitorear la expresión de los genes: *cep*, *orfU*, *zot* y *ctxAB* del "cassette" de virulencia de *V. cholerae*, construimos fusiones transcripcionales, con las regiones reguladoras potenciales de cada uno de estos genes, al gene de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB), el cual fue usado como gene reportero. Las fusiones transcripcionales se clonaron en el vector pBR325 y pUC19 y se determinó su expresión en *E. coli* DH5 α y *V. cholerae* JBK70 El Tor (delección cromosomal *ctxAB*; fenotipo CTB-). Para determinar la actividad transcripcional de las potenciales regiones reguladoras *V. cholerae* fue crecida en condiciones AKI-SW las cuales favorecen la producción de la toxina de cólera (CT) en cepas El Tor. Además del efecto de las condiciones de cultivo, se estudió el efecto de ToxR, el regulador transcripcional positivo de *ctxAB* sobre estas fusiones en el huésped heterólogo *E. coli*.

Este proyecto de investigación fue iniciado cuando los genes de la región "core" y secuencias de inserción del elemento genético CTX, eran llamados el "cassette" de virulencia de *V. cholerae*. Este nombre le fue asignado por un lado por las características de ser un grupo de genes de virulencia, considerado "móvil", flanqueados por secuencias de inserción (Trucksis et al., 1993). Por otra parte, la secuencia nucleotídica del "cassette" permitía proponer la existencia de los genes *cep* (core encoded pillin), *orfU* (open reading frame unknown), *ace* (accessory cholera enterotoxin) y *zot* (zonula occludens toxin) además del operón *ctxAB*. Los datos experimentales sobre la expresión de los genes *ace* y *zot*, en *E. coli* demostraban actividad enterotoxigénica en cámara de Ussing, y en asa ligada de conejo semejantes a aquéllos encontrados en sobrenadantes de *V. cholerae* silvestre (Baudry et al., 1992; Trucksis et al., 1993). En lo que respecta a la función de Cep, era conocido que la mutación del gene correspondiente provocaba una deficiencia en colonización por *V. cholerae* (Pearson et al., 1993). El gene *orfU* se había comparado a nivel de nucleótidos y aminoácidos con el banco de datos y no se encontró homología con otros genes y proteínas reportadas (Trucksis et al., 1993). Con lo anterior se proponía que *ace* y *zot* eran los causantes de la diarrea residual observada en voluntarios, con las cepas vacunales CVD101 y 0395N1, que eran mutantes negativas en *ctxAB*. Todo ello justificaba la propuesta de un "cassette" de virulencia. En términos de regulación genética ya existía una propuesta que explicaba la regulación del operón *ctxAB* por los reguladores transcripcionales ToxR/S y ToxT (Figura 2) (DiRita et al., 1991), pero se

desconocía si existía regulación por ToxR/S y ToxT, o por otros reguladores, de los genes del "cassette" de virulencia

Nosotros nos interesamos por tratar de determinar, en primer lugar, si los genes *cep*, *orfU*, y *zot*, eran regulados por las condiciones de cultivo, y el posible mecanismo responsable, incluyendo la posibilidad de una regulación conectada con la del operón *ctxAB*, es decir, que fueran regulados por ToxR.

Del análisis de la secuencia nucleotídica de los genes *cep*, *orfU*, *ace*, *zot* y *ctxAB* en el "cassette" de virulencia postulamos que los genes *cep* y *orfU* podrían poseer un promotor propio. De hecho entre *cep* y *orfU* existe una región intergénica de 106 pb, que podría contener un promotor cercano o aún sobrepuesto con un terminador Rho-independiente. El gene *ace*, no fue incluido para realizar fusiones transcripcionales, porque consideramos que tenía poca probabilidad de tener un promotor independiente debido a que está imbricado con *orfU* en su extremo 5', además de su superposición, en la región 3', con el gene *zot*. Para el gene *zot* queríamos comprobar si en efecto poseía un promotor propio, a pesar de que como se mencionó observamos que el codón de paro de *ace* y el codón de inicio de *zot* están sobrelapados. Por ello, a pesar de que era probable que *orfU*, *ace* y *zot* formaran una sola unidad transcripcional (Figura 3), era necesario explorar la potencial región promotora de *zot* debido a una propuesta de Baudry y colaboradores. Estos autores, analizando un fragmento con la región 3' del gene *ace* y el gene *zot* completo, clonado en el vector pBR325 y expresado en *E. coli*. Encontraron una actividad enterotóxica comparable a la actividad en *V. cholerae*, y de acuerdo con esto propusieron que el gene *zot* poseía su propio promotor. Tal promotor estaría localizado dentro del gene estructural de *ace* (Baudry et al., 1992).

En este trabajo se obtuvieron resultados en *E. coli* que sugieren que ambos *cep* y *orfU* poseen una región promotora. Sin embargo, los valores de expresión fueron afectados por el tipo de vector de clonación. Así, mientras en pBR325 la fusión *RorfU-ctxB* dió una actividad de 256 ng/ml de CTB y *Rcep-ctxB* de 46 ng/ml de CTB (Tabla A), cuando se usó pUC19 estos valores fueron 465 y 365 ng/ml (TablaB), respectivamente. Por su parte la fusión *Rzot-ctxB* dió un nivel de expresión de 15 ng/ml, en pBR325 y 207 ng/ml en pUC19 (Tabla A y B). Para la fusión *Pctx-ctxB* se encontró un nivel de expresión de 15 ng/ml de CTB usando pBR325 pero de 220 ng/ml en pUC19 (Tabla A y B). Esto sugiere que por encima de la posible actividad promotora de las regiones que anteceden a *cep* y *orfU* hubo un efecto por el uso de pUC19, a

pesar de haber insertado las regiones clonadas en dirección opuesta al promotor *lac* en el vector. La actividad del promotor de *ctx*, en el plásmido pCVD15, el cual lleva clonado el "cassette" de virulencia en pBR325 (Kaper et al., 1984) fue igual a aquella de nuestra fusión transcripcional con *Pctx-ctxB*, clonada en el vector pBR325 (15 ng/ml)(Tabla A). Aquí, el bajo nivel de expresión es consistente con una actividad mínima del promotor de *ctx* en *E. coli* (Miller y Mekalanos, 1984), que requiere del activador transcripcional ToxR (Miller y Mekalanos, 1987). En resumen, tomando en cuenta los datos en pBR325 un plásmido con bajo número de copias (25 copias por célula) y suponiendo un efecto transcripcional positivo debido al uso de pUC19 un vector con alto número de copias (250 copias por célula), quedaba abierta la opción de que *cep* y *orfU* poseyesen una región promotora. Por otra parte, existía también la posibilidad de que, al igual que *ctxAB*, el promotor de *zot* tenía muy baja actividad en *E. coli* porque requería de un activador solo presente en *V. cholerae*. Dado que existía la posibilidad de que los genes bajo estudio estuviesen sujetos a regulación por ToxR decidimos probar si nuestras fusiones transcripcionales eran activadas en *E. coli* por el regulador transcripcional ToxR expresado bajo promotor de *tac* y suplementado *en trans*. En estos experimentos encontramos que las fusiones *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB* y *Rzot-ctxB*, clonadas en el vector pBR325, no fueron activadas por el regulador transcripcional ToxR. Más aún, se observaron niveles inferiores de transcripción en presencia del plásmido con *toxR*, con lo cual cabría mejor la posibilidad de una represión por ToxR. Sin embargo, el hecho de que los cultivos fueron de corto tiempo (3 horas después de la inducción de *toxR*) podría haber sido la causa de los bajos niveles de expresión en esos experimentos, si se les compara con los otros cultivos, que se realizaron a tiempos prolongados (toda la noche).

Un efecto global negativo de ToxR sobre todas las fusiones transcripcionales probadas no parece ser la explicación a lo observado con *Rcep-ctxB* y *RorfU-ctxB* ya que la fusión *Pctx-ctxB* fue claramente activada por ToxR con un incremento aproximado de 18 veces, bajo idénticas condiciones de cultivo (Tabla C). Este incremento es inferior a lo reportado por Miller y Mekalanos, quienes refieren un aumento transcripcional aproximado de cien veces, usando *ctx-lacZ* (Miller y Mekalanos, 1984). La disparidad en resultados podría deberse a diferencias en el tamaño del inserto, al tiempo de adición del inductor IPTG, al tiempo total de cultivo y a que Miller y Mekalanos usaron una construcción que incluía no solo ToxR sino también ToxS. Pensamos que la presencia adicional de ToxS podría ser muy importante ya que el heterodímero

ToxR/S tiene mayor afinidad por el promotor de *ctx* (Otteman et al., 1992). Para determinar si habría un aumento en la expresión de las diferentes fusiones transcripcionales al colocarles en su hospedero natural las construcciones fueron transferidas a *V. cholerae*. En estos experimentos se encontró que la expresión de *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB* y *Rzot-ctxB* que fue claramente positiva en *E. coli*, sobre todo usando pUC19, se tornó negativa en *V. cholerae* (Tabla D y E). El único caso de expresión en *V. cholerae* fue el de la construcción *Pctx-ctxB* cuya actividad fue muy baja con pBR325 y mayor con pUC19 pero aún de un nivel inferior al observado en *E. coli*. Mas aún, no se observó estímulo en la expresión, de ninguna de las fusiones, por cultivo en condiciones AKI-SW, o aún bajo condiciones no AKI-SW.

La falta de expresión de *Rzot-ctxB* y el bajo nivel de expresión, y ausencia de regulación, para *Pctx-ctxB* en *V. cholerae* se discute en una sección mas abajo.

Los resultados de ausencia de expresión de *Rcep-ctxB* y *RorfU-ctxB* podrían explicarse por:

a).-Que *cep* y *orfU* sean objeto de regulación negativa estricta en *V. cholerae* por ToxR mismo, o aún por otro regulador. En este último caso y con el hallazgo de que los genes del "cassette" de virulencia forman parte del bacteriófago CTX ϕ surge la necesidad de analizar nuestros resultados dentro de este nuevo marco biológico. La secuencia nucleotídica de la región RS2, recientemente reportada (Waldor et al., 1997), localizada en el extremo 5' de CTX ϕ , comprende tres marcos de lectura que son *rstR*, *rstA2* y *rstB2*. Por análisis funcional se ha determinado que el gene *rstR* codifica para un represor transcripcional de *rstA2* y es posible que este represor, u otro dentro de esta región sea capaz de reprimir también a otros de los integrantes del genoma del bacteriófago CTX ϕ (Waldor et al., 1997), entre ellos podría estar *cep* y/o *orfU*. Es posible que, además de una regulación transcripcional, el gene *orfU* esté sujeto a represión por otra vía, si se le considera el equivalente al gene III de M13. La proteína III de M13 se produce en muy bajas cantidades (tres unidades), si se le compara con la proteína VIII (2 800 unidades por fago). El gene III de M13 es regulado negativamente a nivel traduccional por el producto del gene V, el cual es considerado un regulador maestro que actúa negativamente también sobre los genes I (equivalente a *zot*), II (equivalente a *rstA2*), y X. Interesantemente, el gene V está además sujeto a autoregulación (Zaman et al., 1990).

b).- Que la expresión observada en *E. coli* sea artefactual, es decir que el fragmento clonado no posea un promotor propio sino que este haya sido creado por un acto fortuito debido

a complementaridad entre el fragmento clonado y secuencias dentro del vector. En primer lugar esta propuesta no sería compatible con el hecho de que *Rcep-ctxB* y *RorfU-ctxB* se expresaron bien en pBR325 y en pUC19. Ese no fue el caso para *Rzot-ctxB* y *Pctx-ctxB* cuya expresión fue muy baja en pBR325 comparada con pUC19. Si los genes se expresan a partir de sus propias señales de transcripción, es posible proponer secuencias nucleotídicas, candidato a promotor para *cep* y *orfU*, las cuales tienen semejanza con las secuencias consenso que son reconocidas por la RNAPolimerasa σ -70 de *E. coli*. Las potenciales secuencias promotoras y señales Shine-Dalgarno (S/D) para *cep* y *orfU* son :

-35 -10 S/D
Rcep TTGGGA (16N) TCTCAT (14N) AGGAG (7N) ATG

-35 -10 S/D
RorfU TTCTGA (17N) TTAATT (95N) AGGAGG (20N) ATG

No sabemos aún si estas secuencias, sean las responsables de la actividad observada en *E. coli*.

Dentro del análisis del posible efecto de promotores fortuitos en los vectores de clonación y combinándolo con la falta de expresión en *V. cholerae*, debe considerarse que no existe evidencia que sugiera una actividad diferencial de los promotores en vectores entre *E. coli* y *V. cholerae*. Es decir, si un promotor de un vector de clonación es responsable de expresión en *E. coli* generalmente ese mismo promotor es activo en *V. cholerae*. Un ejemplo claro de ello es la expresión de los genes usados para selección de resistencia a antibióticos. Así, si la expresión en *E. coli* fue debida a un promotor ajeno, se hubiese esperado un nivel de expresión semejante en *V. cholerae*, y no una supresión de su expresión.

c).- Que se requiera un elemento que actúe en *cis*, no presente en nuestra construcción, para poder ser expresado en *V. cholerae*. En este sentido los fragmentos amplificados no son mayores a 220 pb, por lo que es posible que la presencia de secuencias corriente arriba sean indispensables para observar actividad de *RorfU-ctxB* y *Rcep-ctxB* en *V. cholerae*. En esta propuesta se consideraría que tales secuencias corriente arriba no serían indispensables para la expresión de *RorfU-ctxB* y *Rcep-ctxB* en *E. coli*.

En lo que se refiere al análisis de nuestros resultados sobre la expresión de *Rzot-ctxB* y *Pctx-ctxB* existe un sólo caso muy reciente en la literatura, en el cual podríamos apoyarnos, éste

se reduce principalmente al gene *zot*. Como se mencionó, se proponía que el gene *zot* no tuviera promotor propio, sin embargo, la expresión observada en *E. coli* fue semejante a la de *Pctx-ctxB*, y aún a la de *ctxAB* (plásmido pCVD15)(Tabla A) ello no nos permitía descartar la presencia de un promotor en la zona *Rzot* clonada. En un estudio, posterior a este trabajo, en el cual se investigó la presencia de promotores dentro del "cassette" de virulencia, Fando et al., proponen que el gene *zot*, tiene un promotor. Estos autores reportan expresión en *V. cholerae* de la fusión transcripcional *Vace zot-ctxA*, clonada en el vector pBR325, en medio LB a 37°C (Fando et al., 1997).

La débil expresión de *Rzot-ctxB* en *E. coli* y la falta de expresión en *V. cholerae* observadas en este trabajo, contrastan con esos hallazgos. La razón de los resultados aparentemente opuestos podrían radicar en diferencias entre las construcciones genéticas:

a).- La construcción de Fando et al., con respecto a la nuestra tiene 12 pb más en el extremo 5' de *zot*, las cuales quedan dentro del gene estructural de *ace*, así como 150 pb más en el extremo 3', que son ya parte del gene estructural de *zot*. Con base en esto se podría proponer que en la región 5' faltante en *Rzot*, exista una secuencia necesaria para la actividad promotora, o bien, que el inicio de traducción para *zot*, no sea el propuesto (Baudry et al., 1992), con la posibilidad que exista una región intergénica entre *ace* y *zot*, y por tanto que el promotor se localice en la región 3' faltante en *Rzot*.

b).- Esta construcción incluyó dos Shine-Dalgarno, el del gene *zot* y el del reportero *ctxB*, lo cual podría generar conflicto a nivel traduccional.

c).- Una explicación mas simple para las diferencias encontradas sería que, al generar el fragmento *Rzot* por PCR, se hallan introducido mutaciones que afectaron el promotor. Aún cuando esto no se puede descartar, cabe señalar que la secuenciación de otras zonas R amplificadas en este trabajo no ha demostrado cambios a nivel de nucleótidos. Igualmente, en los casos donde ha sido posible confirmar patrones de restricción tampoco se ha encontrado sugerencia de cambios introducidos por la amplificación.

En lo que se refiere a la fusión *Pctx-ctxB*, los niveles de expresión observados en *V. cholerae* JBK70 (10 ng/ml)(Tabla D) y *E. coli* (15 ng/ml)(Tabla A) fueron ambos muy bajos. Se esperaba un aumento en la transcripción de esta fusión en *V. cholerae*, tanto por tratarse del hospedero natural como porque se realizaron cultivos bajo la condición óptima de inducción de la regulación positiva por ToxT. Para descartar que la falta de activación observada fuese debida

a errores, generados durante la amplificación por PCR, la región 5' de *ctxA* de nuestra fusión, fue confirmada por secuenciación, comprobando que es idéntica a la predicha y que contiene 8 veces la secuencia repetida en tandem 5'*ttttgat* 3'. Aquí también se pueden establecer comparaciones con los resultados de Fando et al. En ese trabajo se reportó actividad transcripcional del promotor de *ctx-ctxA*, expresado en *V. cholerae* El Tor, con una actividad de 250 ng/ml de CTB. La construcción de Fando et al., lleva un fragmento *VorfUacezot-ctxAB*, clonado en el vector pUC18. La expresión observada en nuestros experimentos con el plásmido pCVD15, el cual contiene el "cassette" de virulencia clonado en pBR325 (Kaper et al., 1984) dió actividad de 196 ng/ml de CTB, en la condición AKI-SW y 112 ng/ml de CTB en condición no AKI-SW (Tabla D). Si bien estos niveles son inferiores a lo reportado por Fando et al debe notarse que ni la actividad reportada por esos autores para *ctx-ctxA* ni la encontrada en este trabajo para pCVD15 están cercanas a la actividad del promotor natural de *ctxA* en el cromosoma la cual le permite a *V. cholerae* El Tor producir de 2,000 a 4,000 ng/ml de CTB, si se le crece bajo condiciones AKI-SW.

Con base en estos resultados proponemos que el DNA en la vecindad natural de *ctxAB* favorece su expresión. Un ejemplo del efecto del DNA adyacente sobre la expresión de genes en *V. cholerae* es el de los genes *acfA* y *acfD*. Cuando estos genes se colocaron en plásmidos en *V. cholerae* sus niveles de transcripción fueron inferiores a aquellos observados cuando se les reintegró a su contexto cromosomal (Parsot y Mekalanos, 1991). Si existe un efecto positivo del contexto cromosomal sobre la expresión de *ctxAB*, quizá ello tenga que ver con la torsión del DNA y, por consiguiente, con la conformación de los sitios de unión para el activador ToxT. Podría hipotetizarse que tal conformación estaría fuera de la óptima cuando las zonas regulatorias se encuentran en plásmido. Un efecto del DNA adyacente podría explicar el bajo nivel de expresión observado para la fusión *Pctx-ctxB*. Por otro lado, no se puede descartar que los resultados obtenidos se deban a alguna deficiencia genética tal como que en la cepa usada *toxRS* y/o *toxT* tengan actividad disminuida, debido por ejemplo a una mutación espontánea. Aún cuando esto se considera poco probable, deberá verificarse la funcionalidad de estos genes.

Hay que señalar que el trabajo reportado por Fando et al., y nuestro trabajo son los únicos datos experimentales de que disponemos para tratar de explicar la débil expresión del promotor de *ctxA* en plásmido y en *V. cholerae*, comparada con la expresión en cepas de *V. cholerae* silvestres.

CONCLUSIONES

-En este trabajo se demostró la utilidad de usar al gene *ctxB* (región estructural), como reportero de la transcripción de potenciales zonas reguladoras (R) de los genes *cep* (*Rcep*), *orfU* (*RorfU*) y *zot* (*Rzot*) así como de la región promotora de *ctxAB* (*Pctx*) usada como control. Todos estos genes, previamente designados como componentes del llamado "cassette" de virulencia, fueron recientemente identificados como integrantes del genoma del bacteriófago CTX ϕ (Waldor y Mekalanos, 1996). Cabe señalar que más recientemente, en una publicación muy relacionada a este trabajo, Fando et al., utilizaron con éxito construcciones análogas para estudiar la transcripción de los genes *ace*, *zot*, *ctxA* y *ctxB*.

-Utilizando el sistema reportero desarrollado, se obtuvo evidencia que sugiere una expresión diferencial de las fusiones transcripcionales *RorfU-ctxB*, *Rcep-ctxB* encontrándose expresión en *E. coli* y no expresión en *V. cholerae*.

-Sustentándose en la expresión en *E. coli* se podría proponer que los genes *cep* y *orfU* tienen promotores propios, y que la falta de expresión observada en *V. cholerae*, se deba a la falta de su contexto cromosomal natural, como se discute al final, o bien que se deba al efecto de un regulador negativo. Para este último caso no se tiene un regulador candidato pero se podría especular que el represor RstR, localizado al inicio del genoma del bacteriófago, podría influir negativamente la expresión de *cep* y *orfU*. En este sentido, cabe hacer notar que el gene *rstR* está presente en el huésped *V. cholerae* aquí usado.

- En *E. coli* ToxR no tuvo un efecto positivo, pero podría tener un efecto negativo, sobre los niveles de transcripción de *Rcep-ctxB* y *RorfU-ctxB* y *Rzot-ctxB* cuando se le suplementa en *trans*. En contraste, ToxR, bajo idénticas condiciones, aumentó de manera indubitable los niveles de transcripción de *Pctx-ctxB*.

-El cultivo de *V. cholerae* bajo condiciones AKI-SW no indujo la expresión de *Rcep-ctxB*, *RorfU-ctxB*, *Rzot-ctxB* ni de *Pctx-ctxB* y tuvo solo un efecto ligero sobre la expresión de *ctxAB*. Esta observación podría tener su explicación en la falta de un contexto apropiado de DNA para las fusiones tal y como se discute en seguida, utilizando a *ctxAB* como ejemplo.

- Se postula que la topología del DNA que circunda el operón *ctxAB* en *V. cholerae* podría tener influencia positiva sobre su transcripción. Esto lo sugiere el bajo nivel de expresión de la fusión transcripcional *Pctx-ctxB* en *V. cholerae*, aunado a que los niveles de expresión de

Pctx-ctxB aumentaron cuando se usó el plásmido pCVD15. En este plásmido el operón *ctxAB* esta precedido, en su extremo 5', por mas de 5 Kpb del DNA cromosomal natural, y que es parte del ahora identificado como bacteriófago CTX ϕ . Esta propuesta es asimismo apoyada por los resultados de Fando et al.(1997), quienes también encontraron que la expresión de *ctxAB*, precedida por una región genética mayor a la nuestra, pero aún en plásmido, fue menor que la expresión del operón silvestre. Por lo tanto, se propone que el DNA corriente arriba induce la transcripción de *ctxAB* en *V. cholerae* y que este efecto se manifiesta mejor cuando el operón se encuentra en su sitio natural en el cromosoma. Alternativamente, el aparente efecto positivo podría ser artefactual y ser debido a un efecto inverso de reducción en la activación por el regulador transcripcional ToxT, merced a un aumento en el número de copias de *Pctx-ctxB* en la célula. Por un lado, un efecto de este tipo no sería compatible ni con los hallazgos de expresión de *ctxAB* (Fando et al 1997) usando a pUC18, que tiene un alto número de copias, ni con el hecho de que tanto la fusión *Pctx-ctxB*, como el segmento de DNA en el plásmido pCVD15, se encuentran en el vector pBR325 por lo que se presume estarían en igual número de copias en la bacteria. Por otra parte, para un efecto deletéreo del número de copias de *ctxAB*, a través de una "titulación" de ToxT se deben de proponer dos tipos de interacción de ToxT con el promotor de *ctxAB*. Una interacción en la cual existiese una unión no productiva, y que responde a las condiciones AKI-SW, dependiente de un bajo número de copias de *ctxAB* y, una unión no productiva, que ocurriría en presencia de múltiples copias de *ctxAB*. No obstante, a la fecha no existe ninguna evidencia en la literatura que sugiera este tipo de interacción de ToxT con la región control de la transcripción de CT u otros promotores. En resumen, parece probable que la ubicación de *ctxAB* en su contexto cromosomal es clave tanto para su expresión basal como para la respuesta a las condiciones AKI-SW. Por extensión, no se puede descartar que los genes *cep* y *orfU*, y quizá *zot*, requieran también del contexto cromosomal para su expresión y para el efecto de potenciales reguladores. Ello no sería compatible con la sugerencia anterior sobre el efecto de un represor hipotético, ya que entonces debería proponerse que el represor actuaría sobre *Rcep*, *RorfU*, y quizá *Rzot*, a pesar de encontrarse estas regiones genéticas fuera de su ambiente cromosomal. A menos que se tratarse de un caso combinado de no activación por falta del contexto cromosomal y de represión aún en ausencia de él.

APENDICE

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas bacterianas y plásmidos que fueron utilizados en el presente trabajo se describen en la Tabla No 1. *E. coli* DH5 α y *V. cholerae* JBK70 El Tor (delección cromosomal *ctxAB*, fenotipo -CTB); fueron usadas como hospederas en el estudio de la regulación de los genes *cep*, *orfU*, *zot* y *ctxAB*.

Medios de cultivo.

El medio de cultivo que se usó para crecer *E. coli* DH5 α y *V. cholerae* JBK70 El Tor fue medio AKI cuya composición es la siguiente: se disolvió en 1 000 ml de agua bidestilada 15 g de bactopectona, 4 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl. Cuando fue necesario el medio AKI se preparó con los siguientes antibióticos: Ampicilina 100 μ g/ml, tetraciclina 15 μ g/ml, ó 2.5 μ g/ml, cloranfenicol 25 μ g/ml. Cuando se empleó el sustrato IPTG se agregó para tener una concentración final de 100 μ g/ml.

Soluciones.

-Amortiguador tris boratos 5X (54 g tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA pH 8 0.5 M, aforar a 1 000 ml. estéril).

-Amortiguador WB (glicerol al 10%, estéril).

-Solución 1 (50 mM tris pH 8, sacarosa al 25%, 10 mg de lisozima y 5 μ g de RNAsa tratada con calor (100°C durante 5 min).

-Solución 2 (0.4% de tritón 100 X, 50 mM tris pH 8 y 62.5 mM de EDTA).

-Xgal (100 μ g de Xgal en 5 ml de N,N dimetil formamida).

-Amortiguador PBS 10 X (12.36 g fosfato de sodio dibásico, 1,8 g de fosfato monobásico de sodio, 85 g de cloruro de sodio, aforar a 1 000 ml. estéril).

-PBSBSA 1X, 0.1% (0.1 g de BSA en 100 ml de PBS 1X).

-PBSTweenBSA 1X, 0.05%, 0.1% (500 μ l de Tween y 0.1 g de BSA en 100 ml de PBS 1X).

-PBSTween 1X, 0.05% (500 μ l de tween concentrado en 1 000 ml de PBS 1X).

-Amortiguador citratos (citrato de sodio 1 M, ajustado a pH 4.5 con ácido cítrico 1M).

-Solución reveladora (10 mg de orto-fenil-diamina en 10 ml de amortiguador citratos 0.1 M pH 4.5).

Extracción y purificación de plásmido.

La extracción y purificación de plásmidos se realizó conforme el protocolo del kit DNA purification system (marca wizard minipreps).

1.- Una asada de la cepa transformante se estrujo en cajas LB sólido con el antibiótico adecuado, y se incubó a 37°C toda la noche.

2.- A continuación una colonia se inoculó en 3 ml de medio LB líquido con el antibiótico adecuado, y se incubó con agitación a 37°C toda la noche.

- 3.- Se centrifugó en un tubo éppendorf 3 ml de cultivo a 14 000 r.p.m. durante 2 minutos. Se decantó.
- 4.- Se resuspendió la pastilla celular en 200 μ l de solución de resuspensión.
- 5.- Se agregó 200 μ l de solución de lisis y se mezcló suave por inversión del tubo, hasta que la solución se aclaró.
- 6.- Se agregó 200 μ l de solución de neutralización y se mezcló por inversión del tubo.
- 7.- Se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 8.- Se transfirió el sobrenadante (DNA) a un tubo éppendorf nuevo.
- 9.- Se agregó 1 ml de resina de purificación y se mezcló por inversión del tubo.
- 10.- La solución se purificó usando una columna de purificación.
- 11.- Se agregó 2 ml de solución de lavado por la columna de purificación.
- 12.- Se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 3 minutos.
- 13.- A continuación la columna se colocó en un tubo éppendorf nuevo y se agregó 50 μ l de agua bidestilada estéril precalentada (70-90°C), para eluir el DNA.

Extracción de DNA cromosomal de *V. cholerae*.

- 1.- 1 ml de cultivo o/n, se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 5 min.
- 2.- La pastilla celular así obtenida, se resuspendió en 400 μ l de solución 1, y se incubó 10 min a 37°C.
- 3.- Se agregó 40 μ l de EDTA 0.5 M pH 8.0 y 400 μ l de solución 2. y se mezcló por inversión del tubo.
- 4.- Se agregó 400 μ l de SDS al 0.6 % y se mezcló por inversión del tubo.
- 5.- Se calentó brevemente a 65°C y se mezcló muy bien, en vortex.
- 6.- Se agregó 1.2 ml de fenol amortiguado y se mezcló por inversión del tubo. Posteriormente la suspensión se centrifugó en éppendorf a 14 000 r.p.m., durante 5 minutos.
- 7.- La fase acuosa (fase superior) se colectó y se repitió el paso 6.
- 8.- Para extraer el DNA se agregó 1 ml de cloroformo. Se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 5 min.
- 9.- Posteriormente se agregó 100 μ l de acetato de amonio 7.5 M. por cada 900 μ l de DNA y 2.5 volúmenes de etanol al 95%. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 10.- Se centrifugó en éppendorf a 14 000 r.p.m. durante 10 min. Se decantó.
- 11.- La pastilla se lavó con etanol al 70% y nuevamente se acentrifugó a 14 000 r.p.m. durante 10 minutos. Se decantó.
- 12.- La pastilla se secó a temperatura ambiente.
- 13.- Al final, la pastilla, se resuspendió en 50 μ l de agua estéril dejando disolver el DNA por sí solo a temperatura ambiente.

Amplificación de DNA por medio de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Las regiones reguladoras potenciales y el gene *toxR* fueron generados por amplificación usando las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción:

79.0 µl de agua bidestilada estéril.

10.0 µl de amortiguador PCR Gibco-Brl (10 X sin magnesio).

1.0 µl de dNTPs (2.5 mM cada uno).

6.0 µl de MgCl₂ (de una solución 50 Mm).

1.0 µl de plásmido pCVD15 (1 ng/ml) o 1.0 µl de DNA cromosomal *V. cholerae* JBK70

1.0 µl de oligo 1

1.0 µl de oligo 2

cep1. 5' CTCTACTGCAGCTTAACCCATTATGTCTGGAACGAG 3' (100 pmol/µl)

cep2. 3' CAGAGTAAATAGGTGCCATTTCTTAAGTTGG 5' (100 pmol/µl)

orfU1. 5' CCAAGTACTCGCGGCTGCAGATGCGGG 3' (100 pmol/µl)

orfU2. 3' CACAGCCCGAATATAAACCAAATTCTTAAGCACC 5' (100 pmol/µl)

zot1 5' CTCGACTGCAGCGGTATTATGTGGATTGAGAGC 3' (100 pmol/µl)

zot2. 3' GTGCCGCGC°CGCTTAAGACGTG 5' (100 pmol/µl)

ctx1. 5' CAAGCGCTGCAGGTAGAAGTGAAACGGGG 3' (100 pmol/µl)

ctx2. 3' CTAGTTAATAAAAAGACAATTTGTTTCTTAAGCCC 5' (100 pmol/µl)

toxR1. 5' AGTAAAGTCTGCAGTGTTGGGAC 3' (100 pmol/µl)

toxR2. 3' CTCATCTTCGAACGATACGTTTA 5' (100 pmol/µl)

1.0 µl de enzima Pfu polimerasa (2.5 U/µl).

Al final se mezcló suave y se agregó 100 µl de aceite mineral estéril.

Las temperaturas usadas fueron :

Paso 1.- 1 ciclo (94°C 1min, 62°C 5 min, 72°C 5 min)

paso 2.- 30 ciclos (94°C 1 min, 62°C 2 min, 72°C 4 min)

paso 3.- 1 ciclo (72°C 10 min)

Restricción de DNA.

Los plásmidos y el DNA cromosomal de *V. cholerae* fue digerido con enzimas de restricción a 37°C, durante 3 hrs. Los productos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción a 37°C, durante 24 hrs.

Electroforesis en gel de agarosa.

Los geles se prepararon disolviendo por calentamiento 1.0 g de agarosa de bajo punto de fusión en 100 ml de amortiguador tris boratos 1X. Las muestras con el DNA se corrieron a 86 volts. Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (1µg/ml).

Purificación de DNA del gel de agarosa.

La purificación de bandas de DNA se realizó conforme al protocolo del kit glass max system (marca Gibco-Brl).

- 1.- El DNA digerido con enzimas de restricción, se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. En el primer pozo se colocó el marcador de pesos moleculares y en los pozos restantes se pusieron réplicas de la muestra digerida.
- 2.- Una vez que las bandas de DNA fueron separadas, se procedió a cortar fragmentos de agarosa, las cuales contenían el DNA a purificar.
- 3.- A cada fragmento de agarosa se le agregó 450 µl de solución de unión y 20 µl de amortiguador ayudador y se incubó durante 7 minutos en baño maría a 50°C, para disolver la agarosa.
- 4.- Una vez disuelta la agarosa, la solución se colocó en la columna glass max spin y posteriormente se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 20 segundos.
- 5.- A continuación se agregó a la columna 400 µl de amortiguador de lavado y posteriormente se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 20 segundos. Este paso se repitió dos veces. Al final se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 20 segundos.
- 6.- La columna se transfirió al tubo colector de muestra. Finalmente se agregó 40 µl de agua bidestilada estéril precalentada (70-80°C) y se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 20 segundos para eluir el DNA.

Ligación de DNA.

Para ligar se usó una mezcla 2:1 inserto/ vector, amortiguador de ligasa (5X) Gibco-Brl y la enzima T4 DNA ligasa (40 U/µl).

La ligación de DNA se realizó incubando a 14°C toda la noche.

Preparación de células electrocompetentes *E. coli* DH5α y *V. cholerae* JBK70.

Las células electrocompetentes fueron preparadas para la transformación siguiendo el protocolo (Gibco- Brl). El procedimiento empleado fue el siguiente:

***E. coli* DH5α:**

- 1.- Se estirió la cepa en cajas de LB sólido y se incubó a 37°C toda la noche.
- 2.- Una colonia se inoculó en 50 ml de medio SOB sin magnesio (pH 7.5 con KOH), en un matraz de 500 ml y se creció a 37°C toda la noche. Posteriormente se agregó 20 ml de MgSO₄ 1M. Las células se crecieron en un matraz de 500 ml con suficiente aereación, 200 r.p.m. a 37°C toda la noche.
- 3.- De este cultivo se transfirió 0.5 ml de inóculo en un matraz de 3 litros con 500 ml de medio SOB y se creció con suficiente aereación 200 r.p.m. a 37°C. Cuando el cultivo celular alcanzó una D_{0.550nm} de 0.8, las células se colectaron por centrifugación a 5 000 r.p.m. durante 10

minutos a 4 °C.

4.- La pastilla celular así obtenida, se resuspendió en 500 ml de amortiguador WB (glicerol al 10% estéril) frío y nuevamente se centrifugó a 5 000 r.p.m. durante 15 minutos. Se decantó.

5.- Se repitió el paso anterior.

6.- A continuación la pastilla celular se resuspendió en 200 µl de amortiguador WB frío y la suspensión celular se transfirió a tubos éppendorf en alicuotas de 200 µl.

7.- Se congeló con hielo seco.

8.- Finalmente las células se almacenaron a -70°C.

***V. cholerae* JBK70.**

1.- Se estiró la cepa de *V. cholerae* en caja de LB sólido y se incubó a 37°C toda la noche.

2.- Se inoculó con asada 100 ml de LB líquido en un matraz de 500 ml y se incubó con agitación a 150 r.p.m. a 37°C hasta llegar a la fase estacionaria.

3.- Una vez alcanzada la fase estacionaria el cultivo se centrifugó a 5 000 r.p.m. durante 10 min a 4°C. Se decantó.

4.- La pastilla celular así obtenida, se resuspendió en 100 ml de amortiguador WB frío.

5.- Posteriormente se centrifugó a 6 500 r.p.m. durante 15 minutos. Se decantó.

6.- Se repitió el paso 4.

7.- Nuevamente se centrifugó a 6 500 r.p.m. durante 15 minutos. Se decantó.

8.- La pastilla celular así obtenida, se resuspendió en 200 µl de amortiguador WB frío y la suspensión celular se transfirió a tubos éppendorf en alicuotas de 200 µl.

9.- Se congeló con hielo seco.

10.- Finalmente las células se almacenaron a -70°C.

Electroporación.

La electroporación se realizó por la técnica de electroporación de alta eficiencia (Gibco-Brl).

1.- Para la transformación se mezcló en un tubo éppendorf 1 µl de producto de ligación y 25 µl de células electrocompetentes.

2.- La mezcla se colocó en celdas de microelectroporación y se electroporó empleando el control de pulso a 330 F, 8 Kv y 2.65 ohms.

3.- Una vez realizada la electroporación, las células fueron transferidas a un tubo éppendorf con 1 ml de medio SOB (Gibco-Brl) sin magnesio. Inmediatamente la suspensión celular se incubó a 37°C con agitación durante 1 hora.

4.- Concluido el periodo de incubación se tomaron 200 µl del cultivo y se esparcieron en cajas LB sólido con el antibiótico adecuado.

5.- Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

Sonicado de células de *E. coli* DH5 α para ensayos de GM1-ELISA.

1 ml de cultivo de cada muestra se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 2 minutos, a continuación se separó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 500 μ l de PBS 1X. Las células así resuspendidas, fueron sonicadas 3 veces con pulsos de 30 segundos con intervalos de descanso de 30 segundos. Al final los extractos celulares se mantuvieron a -20°C.

Sobrenadantes de *V. cholerae* 01 JBK70.

1 ml de cultivo de cada experimento se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 2 minutos a continuación se separó el sobrenadante. Al final los sobrenadantes se mantuvieron a -20°C.

GM1-ELISA.

- 1.- La caja se forró con 100 μ l de GM1 en cada pozo y se incubó a 4°C toda la noche.
- 2.- La caja se lavó 3 veces con PBS 1X.
- 3.- La caja se saturó con 200 μ l de PBS BSA 1X 0.1%, durante 30 min a temperatura ambiente.
- 4.- La caja se lavó 3 veces con PBS 1X.
- 5.- Las diluciones se hicieron de la siguiente manera: de la segunda hilera a la última se pusieron 100 μ l de PBS 1X. En la primera hilera se pusieron 200 μ l de sobrenadante de crecimiento o extractos celulares. Se tomaron 100 μ l y se fueron pasando de pozo en pozo subiendo y bajando 7 veces y se desecharon 100 μ l al final. Lo mismo se hizo para el control CTB (1 μ g/ml).
- 6.- Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
- 7.- Se lavó 3 veces con PBS Tween (1X 0.05%)
- 8.- Se diluyó 100 μ l del anticuerpo monoclonal LT39 (dirigido a CTB) en 10 ml de PBS Tween BSA (1X 0.05% 0.1%). 100 μ l del anticuerpo se colocó en cada pozo.
- 9.- Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
- 10.- La caja se lavó 3 veces con PBS Tween (1X 0.05%).
- 11.- Se diluyó 10 μ l de conjugado (goat anti-mouse peroxidasa) en 10 ml de PBS Tween BSA 1X 0.05% 0.15%). 100 μ l de conjugado se colocó en cada pozo.
- 12.- Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
- 13.- La caja se lavó 3 veces con PBS Tween (1X 0.05%).
- 14.- Se agregó 100 μ l de solución reveladora (10 mg de orto-fenilen-diamina, 10 ml de amortiguador citratos 1X más 8 μ l de peróxido de hidrógeno) en cada pozo.

Al final se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

Tabla 1. Cepas Bacterianas y Plásmidos

CEPAS	GENOTIPO RELEVANTE	REFERENCIA
<i>E. coli</i> DH5 α	F'/endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 Δ (lacZYA-argF)	Raleigh et al., 1989.
<i>V. cholerae</i> JBK70 01 El Tor	Delección cromosomal de <i>ctxAB</i> (fenotipo -CTB)	Kaper et al., 1984.
PLASMIDOS		
pBR325	Vector de clonación	Bolivar et al., 1977.
pCVD15	pBR325 con un inserto de 12 Kpb de DNA cromosomal de la cepa <i>V. cholerae</i> 0395 clásica ogawa, conteniendo el profago CTX ϕ . Inserción en el sitio <i>Hind</i> III.	Kaper et al., 1984.
pBR325 ∇ <i>ctxB</i>	Inserción del gene reportero <i>ctxB</i> . Inserción <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.
pBR325 ∇ R <i>cep-ctxB</i>	Fusión transcripcional de la región 5' del gene <i>cep</i> al gene reportero <i>ctxB</i> . Inserción <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.
pBR325 ∇ R <i>orfU-ctxB</i>	Fusión transcripcional de la región 5' del gene <i>orfU</i> al gene reportero <i>ctxB</i> . Inserción <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.

pBR325∇Rzot-ctxB	Fusión transcripcional de la región 5' del gene zot al gene reportero ctxB. Inserción <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.
pBR325∇Pctx-ctxB	Fusión transcripcional de la región 5' del operón ctxAB al gene reportero ctxB	Este trabajo.
pUC19	Vector de expresión	Yanisch-Perron et al., 1985.
pUC19∇ctxB	Inserción del gene reportero ctxB. Inserción <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.
pUC18∇ctxB	Inserción del gene reportero ctxB. Inserción <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.
pUC19∇Rcep-ctxB	Fusión transcripcional de la región 5' del gene cep al gene reportero ctxB. Inserción <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.
pUC19∇RorfU-ctxB	Fusión transcripcional de la región 5' del gene cep al gene reportero ctxB. Inserción <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.
pUC19∇Rzot-ctxB	Fusión transcripcional de la región 5' del gene zot al gene reportero ctxB. Inserción <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.

pUC19VP ctx - $ctxB$	Fusión transcripcional de la región 5' del gene zot al gene reportero $ctxB$. Inserción <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III.	Este trabajo
pMMB66	Vector de expresión	
pMMB66V $toxR$	Inserción del gene $toxR$ bajo el control de Ptac. El gene $toxR$ fue amplificado por la técnica de PCR usando como templado DNA cromosomal de la cepa <i>V. cholerae</i> JBK70 01 El Tor. Inserción <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III.	Este trabajo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Baudry, B., Fasano, A., Ketley, J., and Kaper, J. (1992) Cloning of a gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* vol. 60 pps:428-434.
- Benítez, J. A., J. Silva, B. L. Rodríguez, R. Fando, J. Campos, A. Robert, H. García, L. García, L. Pérez, R. Oliva, C. A. Torres, y T. Ledón. (1996) Genetic manipulation of *V. cholerae* for vaccine development: construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. *Arch. Med. Res.* 27 pps:275-283.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H. L., Boyer, H.W., Crosa, J. W., y Falkow (1977) Construction and characterization of new cloning vehiclesII. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 pps: 95-113.
- DiRita, V., y Mekalanos, J. J. (1991) Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell* 64 pps: 29-37.
- DiRita, V., Parsot, C., Jander, G., y Mekalanos, J. J. (1991) Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 88 pps: 5403-5407.
- DiRita, V., Nelly, M., Taylor, K. R. y Braus, P. (1996) Differential expression of the ToxR regulon in Classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over *toxT* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 93 No. 1
- Fando, R., Perez, J.L., Rodriguez, B.L., Campos, J., Robert, A., García, L., Silva, a, and Benítez, J.A. (1997) Promoter activities in *Vibrio cholerae* CTX ϕ prophage. *Infection and Immunity* vol pps: 1561-1565.
- Fasano, A., Baudry, B., Pumphin, D.W., Wasserman, S :S., Tall, B.D., Ketley, J.M., and Kaper, J. B. (1991) *Vibrio cholerae* produce a second enterotoxin, which affects intestinal tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 88 pps: 5242-5246 June 1991.
- Golberg, I., and Mekalanos, J. J. (1986) Effect of a *recA* mutation on cholera toxin gene amplification and deletion events. *J. Bacteriol* 165: pps: 723-731.
- Higgins, D. E., Nazareno, E., y DiRita, V. (1992) The virulence gene activator ToxT from *Vibrio cholerae* is a member of the Ara C family of transcriptional activators. *J. Bacteriology.* 174 pps: 6874-6980.
- Higgins, D. E., y DiRita, V. (1994) Transcriptional control *toxT*, a regulatory gene in the ToxR regulon of *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* 14 pps: 17-29.
- Higgins, D. E., y DiRita, V. (1996) Genetic analysis of the interaction between *Vibrio cholerae* transcriptional activator ToxR and *toxT* promoter DNA. *Journal of Bacteriology.* vol. 178 No. 4 pps: 1050-1087.
- Iwanaga, M., Yamamoto, K., Higa, N., Ichinose, Y., Nakasone, N., and Tanabe, M. (1986) Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* 01 El Tor. *Microbiol. Immunolog.* vol. 30 (11) pps: 1075-1083.
- Kaper, J. B., y Levine, M. M. (1981) Cloned cholera enterotoxin genes in study and prevention of cholera. *Lancet* ii. pps: 1162-1163.
- Kaper, J. B., Lockman, H., Baldini, M.M., and Levine, M. M. (1984) A recombinant live oral

cholera vaccine. *Biotechnology* april 1984 pps: 345-349.

-Kaper, J. B., Morris, J.G., and Levine, M. M. (1995)

Clin. Microbiol. Rev 8 pps: 48-86.

-Levine, M. M., Kaper, J. B., Herrington, D., Lonosky, G., Morris, J. G., Clemens, M. L., Black, R. E., Tall, B., and Hall, R. (1988) *Infect. Immun.* 56. pps: 161-167.

-Mekalanos, J. J., Swartz, G. D., Pearson, N., Harford, N., Groyne, F., and de Wilde, M. (1983) Cholera toxin genes : nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine developmen. *Nature* (London) 306 pps: 551-557.

-Mekalanos, J. J. (1983) Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. *Cell* 35 pps: 253-263.

-Miller, V. L., y Mekalanos, J. J. (1984) Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by ToxR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol. 81 pps: 3471-3475.

-Miller, V., Taylor, R. K., y Mekalanos, J. J. (1987) Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a membrane DNA binding protein. *Cell* 48 pps: 271-279.

-Miller, V. L., and Mekalanos, J. J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmorregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170 pps:2775-2583.

-Miller, V.L., DiRita, V., y Mekalanos, J. J. (1989) Identification of *toxS*, a regulatory gene whose products enhances ToxR-mediated activation of the cholera toxin promoter *Journal of Bacteriology.* vol. 171 No. 3 pps: 1288-1293.

-Otteman, K.M., DiRita, V.J., and Mekalanos, J.J.(1992) ToxR proteins with substitutions in residues conserved with OmpR fail to activate transcription from the cholera toxin promoter. *J. Bacteriology* 174 pps: 6609-6814.

-Otteman, K.M., y Mekalanos, J.J et al., (1996) The protein ToxR of *Vibrio cholerae* forms homodimers and heterodimers. *Journal of Bacteriology* vol.178 No 1 pps: 156-162.

-Parsot, C., y Mekalanos, J. J. (1990) Expression of ToxR the transcriptional activator of virulence factors of *Vibrio cholerae*, is modulated by the heat shock response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 pps: 9898-9902.

-Parsot, C., and Mekalanos, J. J. (1991) Expression of the *Vibrio cholerae* gene encoding aldehyde dehydrogenase is under control of ToxR, the cholera toxin transcriptional activator. *Journal of Bacteriology.* May 1991 pps: 2842-2851.

-Parsot, C., y Mekalanos, J.J., et al (1992) Structural analysis of the *acfA* and *acfD* genes of *Vibrio cholerae*: effects of topology and transcriptional activators on expression. *Journal of Bacteriology* vol. 174 No.16 pps: 5211-5218.

-Pearson, G.D.N. (1989) The cholera toxin genetic element: a site-specific transposon. Doctoral thesis. Harvard University Medical School, Cambridge, Massachusetts, USA.

-Pearson, G. D., Woods, A., Chiang, S., and Mekalanos, J. J. (1993) CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and intestinal colonization factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 90 pps: 3750-3754. April 1993.

-Peterson, K.P.,and Mekalanos, J. J. (1988) Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR

Regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect. Immunol.* 56 pps: 2822-2829.

-Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B., and Mekalanos, J. J. (1987) Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 pps: 2833-2837.

-Trucksis, N., Galen, J. E., Michalsky, J., Fasano, A., and Kaper, J. (1993) Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol. 90 pps: 5267-5271 June 1993.

-Sanchez, J. and Holmgren, J. (1989) Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol. 86 pps: 481-485.

-Sanchez, J., Johansson, S., Lowenadler, B., Svennerholm, A.-M., and Holmgren, J. (1990) Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res. Microbiol.* vol 141 pps: 971-979.

-Shimada, T., Nair, B. G., Deb, B. C., Albert, M. J., Sack, R. B., and Takeda, Y. (1993) Outbreak of *Vibrio cholerae* non-01 in India and Bangladesh. *Lancet* 341 pps: 1347

-Van Wesembeeck, P., Hulsebos, T., and Schoenmakers, G. (1980) Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. *Gene*, 11 pps: 129-148.

-Waldor, M. K., and Mekalanos, J. J. (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* Vol. 272 pps: 1910-1914.

-Waldor, M. K., Rubin, E. J., Pearson, G. D., Kinsey, H., and Mekalanos, J. J. (1997) Regulation, replication and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX ϕ are encoded by integration region RS2. *Molecular Microbiology* 24 (5) pps: 917-926.

Williams N (1996) Phage transfer: A new player turns up in cholera infection. *Science* Vol. 272 pps: 1869-1870.

-Zaman, G., Schoenmakers, G. G., and Konings, R. H. (1990) Translational regulation of M13 gene II protein by its cognate single-stranded DNA binding protein. *EUR. J. Biochem.* 189 pps: 119-124.

-Zaman, G., Smetsers, A., Kaan, A., Schoenmakers, G. G., and Konings, R. H. (1991) Regulation of expression of the genome of bacteriophage M13 gene V protein regulated translation of the mRNAs encoded by genes I, III, V and X. *Biochimica et Biophysica Acta* 1089 pps: 183-192.

Zaman, G., Kaan, A. M., Schoenmakers, G. G., and Kaning, R.N. (1992) Gene V protein-mediated translational regulation of the synthesis of gene II protein of the filamentous bacteriophage M13: a dispensable function of the filamentous-phage genome. *Journal of Bacteriology.* vol. 174 No 2 pps: 595-600.