

163

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Desarrollo de un sistema de integración de genes heterólogos al cromosoma de *Salmonella typhimurium*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

GUILLERMO PERALES ORTIZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F. 1992.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

Resumen	3
Introducción	
Generalidades de Rotavirus	5
-Importancia clínica	6
-Datos históricos	7
-Estructura	8
-Caracterización inmunológica	11
Vacunas	14
- <i>Salmonella typhimurium</i> atenuada como acarreadora de antígenos heterólogos	16
-Expresión de genes heterólogos en <i>S. typhimurium</i> .	18
Objetivo	
-Objetivo general	23
-Estrategia	23
Material y Métodos	
-Cepas y plásmidos utilizados	26
-Medios de cultivo y antibióticos	.
-Purificación de plásmidos	.
-Purificación de DNA cromosomal bacteriano	27
-Geles para electroforesis	.
-Recuperación de DNA a partir de geles de agarosa	.
-Reacciones de digestión con enzimas de restricción	.
-Reacciones de Ligasa y Klenow	.
-Transformación en <i>E. coli</i>	28
-Transformación en <i>S. typhimurium</i>	29
-Obtención y titulación de fago P22 trasductante	.
-Transducción en <i>S. typhimurium</i>	30
-Ensayos para determinar Termosensibilidad	.
-Selección de dobles recombinantes	31
-Southern	.
-Nick Translation	31
-Construcción del plásmido psusTc ^r	32

Resultados

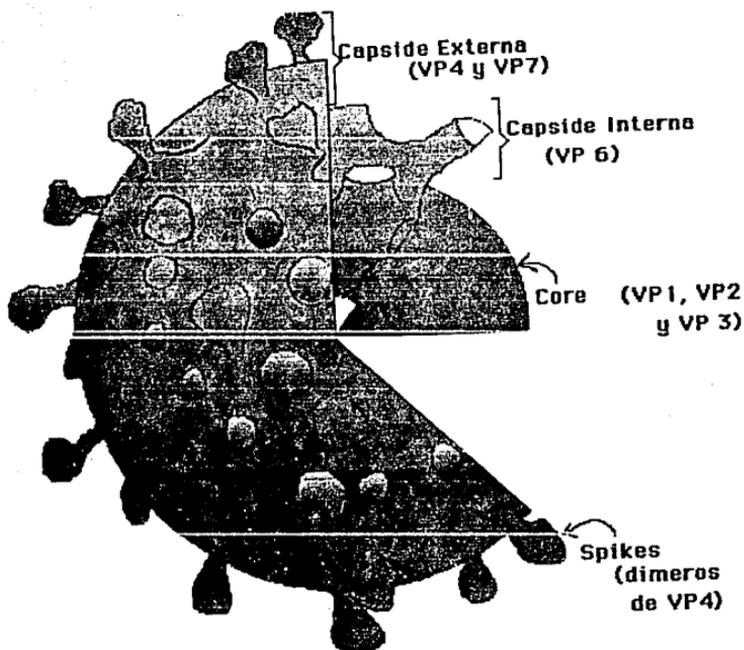
-Construcción del plásmido T ^r -hisG-Tc ^r	33
-Termoestabilidad del plásmido T ^r -hisG-Tc ^r	34
-Transformación en SL5283	34
-Transducción a SL3261	35
-Caracterización SL3261 transducidas	36
-Generación de dobles recombinantes en SL3261	36
-Hibridación tipo Southern	39
Discusión	46
Bibliografía	51

Las enfermedades diarreicas no bacterianas que ocurren entre la población infantil son producidas principalmente por agentes virales pertenecientes al género Rotavirus. Los daños causados por estas enfermedades son considerables, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo.

El conocimiento básico de la estructura, actividad y epidemiología de los rotavirus es importante para el diseño de vacunas que prevengan eficientemente contra la infección por estos virus.

Los rotavirus infectan a enterocitos maduros del epitelio intestinal, no están accesibles a los anticuerpos circulantes y difícilmente pueden ser neutralizados. Anticuerpos secretorios de la mucosa intestinal son más factibles de neutralizar la infectividad de los rotavirus, sin embargo, hasta ahora no se cuenta con sistemas apropiados para inducir anticuerpos específicos a nivel de mucosa intestinal.

Recientemente varios grupos han propuesto la utilización de bacterias patógenas entéricas vivas atenuadas, como vectores de antígenos heterólogos capaces de inducir una respuesta inmune local con anticuerpos secretorios. La cepa *Salmonella typhimurium aroA, hisG*, presenta algunas ventajas para ser utilizada como acarreadora de antígenos heterólogos. Sin embargo el problema de la inestabilidad de los plásmidos en estas bacterias y la dependencia de antibióticos



Esquema 1.- Representación gráfica de un rotavirus, en el corte se observa el core y la cápside interna, en la superficie se observa la cápside externa con los canales y spikes.

limitan su utilización como vacuna viva, por lo cual es recomendable que la información de los antígenos heterólogos este codificada en el cromosoma bacteriano para evitar los problemas inherentes a trabajar con plásmidos.

En el presente trabajo se realizó la construcción de un plásmido termosensible que lleva el gen que confiere resistencia a tetraciclina (Tc), que es un marcador fácil de seleccionar y monitorear, flanqueado por regiones cromosomales del operón de *hisG* de *S. typhimurium*. Con este plásmido se intentó integrar el gene de Tc al cromosoma de *S. typhimurium* mediante una doble recombinación entre las regiones de *hisG* del plásmido y del cromosoma. De esta manera se puede obtener una cepa intermediaria que facilite la posterior integración de genes que codifican para proteínas antigénicas de rotavirus.

Los resultados muestran que la frecuencia de eventos de doble recombinación es menor de 10^{-6} (reportada previamente), lo cual hizo más difícil la selección de las doble recombinantes con el método utilizado, sin embargo, muy probablemente obtuvimos bacterias con el plásmido completo integrado al cromosoma como resultado de eventos de recombinación sencilla.

INTRODUCCION

GENERALIDADES DE ROTAVIRUS

En las últimas dos décadas se ha realizado un gran esfuerzo por describir, comprender y eventualmente poder controlar las enfermedades gastrointestinales; esto como parte de una estrategia mundial para aminorar los problemas de salud y desnutrición de los países en vías de desarrollo.

Las enfermedades diarreicas en humanos son comunes en todo el mundo, incluso en los países desarrollados, pero en los países en desarrollo las gastroenteritis adquieren un significado especial porque llegan a constituir la causa mayor de mortalidad y desnutrición entre la población infantil.

Las gastroenteritis afectan aproximadamente a 500 millones de niños anualmente, de las cuales aproximadamente el 1% son mortales, es decir, cerca de 5 millones de niños mueren anualmente en el mundo debido a las diarreas. (Snyder & Merson, 1982).

Ahora se sabe que estas enfermedades diarreicas además de ser provocadas por bacterias como *Escherichia coli*, *Campilobacter spp.*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, son también provocadas por agentes virales entre los que destacan los rotavirus, adenovirus, virus Norwalk, calicivirus, astrovirus y coronavirus. De todos ellos, se ha reconocido ampliamente a los rotavirus como el principal agente etiológico de las gastroenteritis infantiles en todo el mundo. (Flewett, 1974.)

IMPORTANCIA CLINICA

La infección de rotavirus es propagada por la ruta oral-fecal y las manifestaciones clínicas características son vómito y diarrea; en algunas ocasiones también se presenta fiebre, dolor abdominal e incluso se le han asociado algunos malestares respiratorios, sin embargo el efecto más grave que se observa es la deshidratación.

Otros animales mamíferos y aves de importancia económica para el hombre también son susceptibles de contraer diarreas, provocándoles retraso en el crecimiento, e incluso la muerte, con las pérdidas económicas consecuentes.

Se ha avanzado notablemente en el estudio de los rotavirus y se han desarrollado métodos para su reconocimiento y diagnóstico, tales como: el radioinmunoensayo, los ELISA, la aglutinación en látex, las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, etc. Sin embargo, aún no existen métodos efectivos para prevenir la infección por estos virus. De ahí, que el desarrollo de medidas profilácticas eficientes, económicas y de fácil aplicación sea de gran importancia.

DATOS HISTORICOS.

En 1973, Bishop et al. encontraron y describieron partículas virales, que llamaron "similares a orbivirus", cuando examinaban al microscopio electrónico biopsias duodenales de niños hospitalizados con gastroenteritis aguda no bacteriana. Este fue el primer reporte en el que se involucraba a partículas virales con enfermedades diarreicas de humanos

Ya antes se hubfan reportado trabajos que sugerfan la participación de virus en las enfermedades diarreicas de animales. Light y Hodes en 1941-42, realizaron estudios en becerros; Kraft en 1958 hace lo mismo en ratones; Malherbe los encuentra en 1963 en el lavado intestinal de un mono vervet, y también Mebus et al. en 1969 haciendo ensayos con becerros. Pero es hasta el reporte de Bishop cuando se comienza a dar importancia al estudio de este grupo de virus y se reconsideran seriamente todos estos trabajos previos.

Hasta 1974, en algunos reportes se hace referencia a estos virus con distintos nombres, tales como: "virus parecidos a orbivirus", "agentes parecidos a reovirus", "virus de gastroenteritis infantil" y "duovirus". Flewett et al. en 1974, propusieron el nombre de "rotavirus" (del latin *rota*=rueda), a este nuevo grupo de virus, ya que en el microscopio electrónico las partículas virales presentan proyecciones que sostienen un ligero borde liso y dan la apariencia de una rueda de carreta. Este nombre fue adoptado oficialmente a nivel de género en 1979 por Matthews.

ESTRUCTURA.

Los primeros estudios estructurales de los rotavirus, con microscopía electrónica, en 1975 pusieron de manifiesto una simetría icosaédrica, un tamaño promedio de 65-75 nm y la presencia de dos capas concéntricas de proteínas: la interna y la externa. Las partículas que carecen de la capa externa, tienen apariencia rugosa debido a las proyecciones radiales que la unen con la segunda capa. Las partículas completas, penetradas por tinción negativa revelaron la presencia de un core interno de aproximadamente 38 nm (Esquema 1).

Un estudio más detallado, realizado por Roseto A. et al. en 1979, determinó claramente que el número de triangulación era $T=13$ y que el número de capsómeros del virus era igual a 32, lo que dio fin a algunas controversias al respecto. Posteriormente, Prasad et al en 1988, utilizando criomicroscopía electrónica y técnicas de procesamiento de imágenes con resolución de 4 nm., definieron la existencia de canales que comunican al core con la superficie externa y cuya función biológica no ha sido aclarada aún; así mismo reportaron la presencia de 60 proyecciones o spikes de 5-6 nm, repartidas en toda la superficie de la capa externa.

El genoma del virus consiste de 11 segmentos de RNA de doble cadena, contenidos dentro del core de la partícula viral, a partir de los cuales se producen transcritos de RNA mediante la participación de una RNA polimerasa dependiente de RNA, que se encuentra presente en la partícula viral madura.

Los 11 segmentos genómicos codifican para 11 proteínas, cuyos tamaños están

entre 20 y 125 Kd. A cada segmento se le ha asignado un número de acuerdo al orden en que migran en una electroforesis, siendo el número 1 el segmento más grande y el número 11 el más pequeño. De las 11 proteínas producidas, 6 son estructurales (VP) porque están presentes en la partícula viral madura (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7), las otras 5 son no estructurales (NS) y sus funciones están involucradas en los procesos de replicación y maduración.

El estudio de las proteínas estructurales de capa externa, el conocimiento de su estructura y función, así como la interacción entre sí dentro del virus, es fundamental para entender los mecanismos básicos de reconocimiento, activación y penetración a la célula huésped. Lo que nos ofrece además nuevas alternativas para el diseño de estrategias para prevenir la infección por estos virus.

Se conocen por lo menos dos proteínas en la cápside externa: VP4 y VP7, pero la importancia de cada una de ellas en los diferentes pasos de la infección viral aún no está bien comprendida.

Se sabe que VP4 representa el 15% del total de proteína del virión, que tiene un peso molecular de 88 KDa, que es producida por el segmento genómico 4, que tiene 776 amino ácidos, y que es una proteína no glicosilada. Los spikes del virus están formados aparentemente por dímeros de esta proteína

A VP4 se le han atribuido diferentes funciones, como ser la hemaglutinina viral (Lizano, M. *et. al.* 1991), ser la determinante de la especificidad del huésped del virus y ser la responsable del incremento de la infectividad viral causado por tripsina. En presencia de tripsina, VP4 se corta específicamente en los

aminoácidos 241 y 247 (López *et al.* 1985) dando lugar a dos proteínas llamadas VP5 y VP8, que corresponden al extremo carboxilo y amino de la proteína VP4 original, respectivamente. Este corte produce un incremento en la infectividad del virus de hasta mil veces.

Por otra parte, VP7 representa el 30% del total de proteína en el virión. Esta puede ser codificada por los segmentos 7, 8 ó 9, dependiendo de la cepa de que se trate y tiene 326 aminoácidos (37KDa). VP7 es una proteína glicosilada con residuos de alta manosa y algunos experimentos indican que VP7 es la proteína de unión a la célula. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales se ha mapeado una región que va del a.a. 275 al 295 que se cree forma el dominio involucrado directamente en la adsorción (Sabara M. *et al.* 1985).

CARACTERIZACION INMUNOLOGICA.

Los estudios inmunológicos de los rotavirus han contribuido fundamentalmente en tres grandes áreas:

- a) En el estudio ultraestructural del virus mediante el análisis de epítopes de importancia estructural o funcional, en el virus silvestre o en mutantes de escape a determinados anticuerpos monoclonales;
- b) En la clasificación de los rotavirus, puesto que la distinción en grupos, serotipos y cepas está basada en características inmunológicas. Se han descrito seis distintos grupos de rotavirus (del A al F), entre los cuales no hay reacción

cruzada. Los rotavirus de los grupos A, B y C se han encontrados tanto en humanos como en animales, mientras que, rotavirus de los grupos C, D y F sólo se han encontrado en animales. Sin embargo, los rotavirus del grupo A son los más frecuentes en humanos y todos los datos generales que se describen en esta tesis se refieren a rotavirus del grupo A.

Dentro de cada grupo, los virus se clasifican en serotipos, basados principalmente en la reactividad de las dos proteínas de la cápside externa con anticuerpos que tienen actividad neutralizante (W.H.O. 1984). En muchos casos, cuando se utilizan sueros hiperinmunes, esta reactividad está dada principalmente por la VP7, lo cual se explica por el alto porcentaje en el que se encuentra VP7 con respecto a VP4 en la capa externa del virión.

Hasta ahora, se han distinguido 11 serotipos distintos dentro del grupo A, y se puede decir en términos generales que las VP7 de cepas de un mismo serotipo son muy similares entre sí, pero distintas a las de cualquier otro serotipo.

En cuanto a las VP4, se ha visto recientemente que pueden ser diferentes entre cepas del mismo serotipo, y que pueden ser muy similares entre cepas de distinto serotipo. De hecho esto explica la reactividad cruzada entre algunos serotipos contra un mismo suero hiperinmune.

c) En el estudio de las regiones importantes del virus en la generación de la respuesta inmune humoral y celular del huésped, así como en el estudio de los mecanismos de respuesta inmune del huésped ante la infección, para tratar de entender el proceso de manera global.

VP4 induce inmunidad protectora en animales y es inmunogénica en niños y animales. Los anticuerpos monoclonales contra esta proteína son capaces de neutralizar al virus *in vitro* (Greenberg HB, *et al.* 1983)

VP7 es el mayor antígeno de neutralización que es detectado por sueros hiperinmunes (Bastardo JW, *et al.* 1981, Killen HM, *et al.* 1982). Es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes cuando se encuentra formando parte de las partículas virales (Kalica AL, *et al.* 1981), también cuando se utiliza como proteína aislada (Matsuno S, *et al.* 1983) e incluso cuando se utilizan algunos fragmentos de ella (Sabara M, *et al.* 1985b).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos tanto contra VP4 como contra VP7 son capaces de neutralizar la infectividad viral *in vitro* y de proteger pasivamente a ratones contra la diarrea causada por los rotavirus. Sin embargo, aún no queda claro cual de las dos proteínas es la mejor para ser utilizada como inmunógeno. Esto se debe principalmente a que no existe un buen modelo animal para hacer estudios de protección en rotavirus, y por otra parte, a que los sistemas que se han utilizado para estudios *in vivo* no han sido los más adecuados.

VACUNAS

La infección por rotavirus se limita al intestino delgado, y específicamente a los enterocitos maduros que se encuentran en el extremo distal de los villi. Se ha visto que anticuerpos neutralizantes circulantes contra rotavirus, no protegen contra la infección por estos virus y se cree que una vacuna efectiva debe estimular la respuesta inmune local (anticuerpos secretorios en mucosas) para poder inducir protección.

Una posibilidad es el uso de vacunas vivas, atenuadas, dadas por vía oral. De hecho, los primeros intentos para desarrollar una vacuna se basaron en el enfoque Jenneriano, utilizando cepas vivas que infectan y causan diarrea en animales, pero que están naturalmente atenuados para humanos. Tres son los principales candidatos que se han ensayado más ampliamente: RIT4237, un virus bovino serotipo 6; RRV-MMU18006, un virus de mono rhesus serotipo 3, y WC3, un virus bovino serotipo 6 (Vesikari T, *et al.* 1983. Kapikian AZ, *et al.* 1985, Christy C, *et al.* 1986).

La cepa bovina RIT4237 mostró eficacia cuando se probó en países desarrollados pero no ofreció ninguna protección cuando se probó en países en vías de desarrollo.

La cepa RRV-MMU18006 (RRV) ha sido probada ampliamente pero los resultados han sido inconsistentes debido principalmente a que sólo brinda protección contra serotipo 3.

Las pruebas preliminares que se hicieron en Estados Unidos con el virus WC3 mostraron que puede ofrecer protección contra el serotipo 1. Sin embargo, uno de los problemas para desarrollar la vacuna contra rotavirus es la existencia de por lo menos seis serotipos distintos de rotavirus humano, y aparentemente la resistencia inducida por una infección es principalmente homotípica. Es por ello que se requiere de vacunas polivalentes para lograr obtener una inmunidad de amplio espectro (Flores y Kapikian, 1990).

Este problema ha pretendido solucionarse construyendo virus híbridos, que llevan la proteína VP7 de cada uno de los serotipos que infectan a humanos y el resto del material genético, de un virus animal. Estos virus reasociantes han sido contruidos reemplazando la VP7 de la vacuna RRV por VP7s de rotavirus humanos de serotipos 1, 2 y 4. Los estudios preliminares con estas cepas no han mostrando los resultado esperados y su eficiencia aún no es clara.

La capacidad de manipular los genes con las técnicas modernas de la biología molecular ofrecen nuevas alternativas para diseñar sistemas de protección inmune eficientes. Los genes que codifican para las proteínas VP4 y VP7 han sido clonados en plásmidos y expresados en procariontes como *E. coli* y en sistemas eucariontes como baculovirus.

La caracterización inmunológica de estas proteínas ha mostrado que son capaces de inducir anticuerpos que neutralizan la infectividad viral tanto *in vivo* como *in vitro*.

Salmonella ATENUADA COMO ACARREADORA DE ANTIGENOS HETEROLOGOS.

Varios grupos han propuesto que cepas de bacterias entéricas atenuadas, que lleven genes heterólogos que codifiquen por los antígenos protectores de otro patógeno entérico, podrían ser vacunas orales vivas adecuadas para proteger contra la infección causada tanto por la bacteria entérica como por el otro patógeno. En particular la potente inmunogenicidad de las cepas vivas de *Salmonella* las hace candidatas muy atractivas para la construcción de vacunas recombinantes, especialmente considerando su bien conocida capacidad para inducir anticuerpos circulantes y secretorios así como inmunidad celular.

Los primeros intentos para utilizar cepas atenuadas de *Salmonella* como vacunas vivas orales emplearon mutantes *galE* de *Salmonella typhimurium* y *S. typhi*. Estas mutantes son sensibles a galactosa y presentan un crecimiento limitado *in vitro* (Hone, D. *et al.* 1987., Germanier y Furer 1975). Sin embargo, la mutación que confiere la atenuación a esta cepa, aunque es estable, aún no está claramente identificada.

Posteriormente se reportaron otras mutantes auxotróficas que tenían una deleción en el gene *aroA*, el cual codifica para una enzima de la vía involucrada en la síntesis de ácido corísmico. Esta vía es la única forma en que la bacteria puede sintetizar compuestos aromáticos esenciales tales como los aminoácidos aromáticos, la enteroquelina, vía 2,3 dihidroxibenzoato (DHB), y el ácido p-aminobenzóico (PABA), el cual es un precursor para el ácido fólico y la síntesis

de nucleótidos. Las células de mamíferos no poseen esta vía y por lo tanto, el DHB y el PABA no están disponibles en sus tejidos, debido a esto cepas *aroA* tienen un crecimiento limitado en mamíferos. Estas cepas, probadas en ratones como vacunas vivas, mostraron resultados efectivos (Hoiseth & Stoker 1981).

Las cepas mutantes *aroA* de *S. typhimurium* son más atractivas que las *galE* ya que la mutación está perfectamente identificada (una delección) y es esencialmente irreversible. Además de esto las cepas *aroA* de *S. typhimurium* están altamente atenuadas, ya que la administración oral de 10^{10} bacterias no causa la muerte a ratones, mientras que una dosis de 10^4 bacterias de la cepa silvestre mata al 100% de ratones en pocos días. Sin embargo, las cepas *aroA* pueden establecer infecciones limitadas en los ratones, siendo detectadas en bajo número en ciertos tejidos internos como el hígado y el bazo. La invasividad controlada de esta cepa contrasta con otras cepas atenuadas de *Salmonella* que están mutadas en el gene *purA*, las cuales establecen únicamente una infección superficial, que involucra placas de Peyer y la pared intestinal. Esta diferencia en la invasividad entre las diferentes cepas mutantes puede tener un enorme efecto sobre la inmunogenicidad.

EXPRESION DE GENES HETEROLOGOS EN *S. typhimurium*.

En la tabla 1 se muestra una lista de algunos de los antígenos heterólogos expresados en cepas de *Salmonella*. Teóricamente cualquier segmento de DNA que codifique para un antígeno potencialmente protector puede ser clonado y expresado en cualquier vehículo vivo, pero en realidad aún existen algunas limitaciones prácticas.

Muchos de los antígenos reportados hasta ahora fueron introducidos en *Salmonella* utilizando plásmidos recombinantes que usan sistemas de expresión diseñados originalmente para *E. coli* K12. *Salmonella* y *E. coli* son organismos estrechamente relacionados y muchos promotores que son activos en *E. coli* podrían funcionar en *Salmonella* también. Sin embargo, en muchos casos los sistemas de control de la expresión genética no están presentes en *Salmonella*.

Por otra parte, en las construcciones enlistadas en la tabla 1 se han encontrado varios problemas. La introducción de un plásmido recombinante en una cepa acarreadora necesita llevar un marcador de selección que, generalmente, es la resistencia a un antibiótico. Esta característica es poco deseable para una cepa que se quiere utilizar como vacuna, ya que en teoría existe la posibilidad de transferencia del plásmido, desde la cepa atenuada hasta una bacteria comensal o alguna bacteria ambiental. Además cuando una cepa híbrida lleva un plásmido que se selecciona por su resistencia a algún antibiótico, resulta difícil mantener esta selección *in vivo*, y si el plásmido es inestable en ausencia de selección la eficiencia de la vacuna viva se vería seriamente afectada.

Tabla.- 1

Antígenos Heterólogos Expresados en *Salmonella* spp.

Antígeno	Plásmido/Hospedero	Ref.
Antígeno forma I de <i>Shigella sonnei</i>	Plásmido nativo de <i>S.sonnei/S. typhimurium</i> Ty21a <i>galE</i> .	Traumont, E.C. (1984)
Subunidad-B de la toxina LT-B de <i>E. coli</i> .	pUC / <i>S. typhimurium</i> Ty21a <i>galE</i> ; pBR322 / <i>S. typhimurium aroA</i> .	Clemons, J.D. (1984), Maskell, D. (1987)
Antígeno K88 de <i>E. coli</i> enterotoxigenica porcina	pBR322 / <i>S.typhimurium galE</i> pBR322 / <i>S.typhimurium aroA</i> Vector cromosomal- <i>his</i> / <i>S.typhimurium galE</i> .	Stevenson, G. (1985); Dougan, G. (1986); Hone, D. (1988).
Antígeno de <i>Schistosoma mansoni</i>	pUC / <i>S. typhimurium aro A</i> y <i>S. typhimurium galE</i> .	Taylor, D.W. <i>et al.</i> (1986)
B-Galactosidasa.	pBR322 / <i>S.typhimurium aroA</i>	Brown, A. <i>et al.</i> (1987)
Polisacárido K1 de <i>E. coli</i> .	pBR322 / <i>S.typhimurium aroA</i>	O'Callaghan, D. (1988)
Proteína M5 de <i>Streptococcus pyogenes</i> .	pSC101 / <i>S.typhimurium aroA</i>	Poirier, T.P. (1988)
Secuencia repetida del circunsporozoito de <i>Plasmodium berghei</i> .	pUC / <i>S. typhimurium. cepa</i> WR4017.	Sadoff, J.C. (1988)
Proteína SpaA de <i>Streptococcus sobrinus</i> .	pBR322 / <i>S. typhimurium cya crp</i> .	Curtiss, R., III (1988)
Nucleoproteína de virus de Influenza A.	pBR322 / <i>S.typhimurium aroA</i>	Dougan, G. (1990)
Proteína de membrana externa de <i>Neisseria meningitidis</i> .	pUC / <i>S. typhimurium aroA</i> .	Tarkka, E. (1989)
Fragmento C protectoro de la toxina de <i>Clostridium tetani</i> .	pUC / <i>S. typhimurium aroA</i> , vector cromosomal- <i>aroC</i> .	Strugnell, R.A. (1990)
Hemaglutinina FHA de <i>Bordetella pertussis</i> .	ColE1 / <i>S. dublin</i> .	Molina, N.C. <i>et al</i> (1990)
Proteína VP4 de la cápside externa de rotavirus	pBR322 / <i>S. typhimurium aro</i>	Salas, E. <i>et al</i> , (1991)

Aunque las cepas de la tabla 1 actualmente se estudian a nivel de vacunas experimentales, es claro que muy difícilmente llegarán a ser prácticas. Una buena vacuna práctica deberá cumplir con patrones rigurosos para su aplicación, tales como la inmunogenicidad, la reproducibilidad, la viabilidad y el aspecto de seguridad. Se han realizado esfuerzos encaminados a solucionar estos problemas. Los enfoques consisten en incrementar la estabilidad de los plásmidos, introduciéndoles secuencias como *par* o *ser* que incrementan la estabilidad natural de los plásmidos. También se ha propuesto eliminar los marcadores de resistencia a antibióticos, poniendo en su lugar un gene que sea esencial para la viabilidad de la bacteria, como es el caso de las mutantes *asd* de *Salmonella typhimurium*, que requieren la presencia de un plásmido que lleve el gene *asd* para evitar la lisis celular (Nacayama *et al.* 1988).

Una alternativa interesante es buscar que los antígenos heterólogos ya no sea expresados necesariamente en plásmidos, sino que puedan integrarse directamente al cromosoma de la bacteria acarreadora evitando así el problema de la inestabilidad y la resistencia a antibióticos. Son pocos los trabajos reportados hasta ahora que describan la integración de un gene heterólogo al cromosoma de *Salmonella*, pero ya se ha demostrado que es posible en cepas *galE* y *aro* (Hone D. *et.al* 1988, Strugnell A.R. *et.al* 1990).

En el laboratorio en donde se realizó el presente trabajo ya se han clonado algunas secuencias de la proteína VP7 de rotavirus y se han introducido en plásmidos a cepas de *S. typhimurium* (Salas-Vidal, E. 1990). Sin embargo el

problema de la inestabilidad de los plásmidos en ausencia de la presión selectiva ha impedido continuar con los estudios en esta línea de trabajo. Ante este problema, la posibilidad de insertar en el cromosoma los antígenos que nos interesan surge como una alternativa de gran utilidad.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un sistema para integrar genes heterólogos en el cromosoma de la cepa *aroA* de *Salmonella typhimurium*, SL3261.

Este trabajo está enmarcado en el proyecto global del laboratorio que pretende expresar los genes que codifican para las proteínas VP4 y VP7 de rotavirus en *Salmonella*. Sin embargo, el sistema desarrollado será potencialmente útil para integrar cualquier otro gene heterólogo.

ESTRATEGIA

En este trabajo de tesis no se trató de integrar el gene de algún antígeno en particular, sino que se utilizó un gene que fuera un marcador fácil de monitorear y de seleccionar. Así, se decidió trabajar con el gene de tetraciclina.

Se eligió la región del gene *hisG* cromosomal como el sitio más indicado para llevar a cabo la inserción, ya que este gene *hisG* de *Salmonella typhimurium* SL3261, esta mutado y no es funcional, de esta manera no alteraríamos el fenotipo original de la bacteria.

Esperamos que el gene de tetraciclina flanqueado por regiones del gene *hisG* de *S. typhimurium*, y clonado en un plásmido vector, al ser introducido a la cepa de *Salmonella* pueda integrarse al cromosoma como resultado de una doble recombinación, al reconocerse las regiones homologas del plásmido y del cromosoma.

Aquellas bacterias donde ocurra la doble recombinación pueden seleccionarse de la población por su resistencia a tetraciclina y sensibilidad a algún otro antibiótico cuyo gene de resistencia sea parte del plásmido vector. Para que esto sea posible es necesario hacer que se pierda de la población el plásmido vector original no integrado al cromosoma. A este proceso se le llama curar el plásmido, y existen varios métodos para hacerlo. El método de curación en este trabajo consistió en utilizar un plásmido termosensible, que tiene la propiedad de replicarse y mantenerse normalmente a 29°C, pero a 42°C deja de replicarse y eventualmente se pierde durante el crecimiento de una población de bacterias.

El resultado final deseable, será una cepa sin el plásmido y, resistente a tetraciclina, la cual podría ser usada posteriormente para integrarle cualquier antígeno. Es decir, si construimos un nuevo vector similar al anterior, con el gene del antígeno en lugar del gene de tetraciclina y llevamos a cabo el mismo

procedimiento de integración por doble recombinación, el resultado final sería la entrada del gene del antígeno y la salida del gene de tetraciclina. Después de curar el plásmido, las bacterias en donde se haya llevado a cabo el evento de doble recombinación se pueden seleccionar positivamente por haber perdido la resistencia a tetraciclina (Bochner, B. *et al.*). De esta manera podremos obtener una cepa recombinante que exprese el antígeno de interés de manera estable.

MATERIAL Y METODOS

Cepas utilizadas:

Escherichia coli MC1061 (*araD* 135, Δ [*ara*, *leu* 7697], Δ *lac* X74, *galU*⁻, *galK*⁻, *rk*⁻, *mk*⁻ *strA*, *recA*⁺), se utilizó para la construcción de los plásmidos pSus-Tc y T⁺-HisG-Tc

Salmonella typhimurium SL5283 (*trpC2*, *metA22*, *H1-b*, *fla66*, *rpsL120*, *xgl404*, *metE551*, *hsdL6*, *hsdSB121*, *ile452*, *leu3121.galE*⁵⁰³, *r*⁻, *m*⁻ [sistemas de restricción-modificación]), es una cepa transformable capaz de modificar el DNA de plásmidos heterólogos y reconocerlos como propios.

Salmonella typhimurium SL3261, *aroA*⁻, *hisG*⁻ derivada de la cepa SL1344 (Hoiseth & Stocker 1981).

Fago P22 (HT, *inf*) es un fago de transducción generalizada que puede infectar tanto a SL5283 como a SL 3261, muy utilizado para transferir DNA de una a otra.

Salmonella typhimurium SL5235 utilizada para titular el fago P22.

Salmonella typhimurium ATCC 14028 como control de bacteria protótrofa.

Medios de cultivo:

Los medios de cultivo utilizados para crecer las diferentes cepas fueron Luria (LB) líquido, en placa y agar suave preparados según Maniatis, Frisch & Sambrook, 1985. El medio mínimo M9 se preparó según Miller, HJ 1977, suplementado con PABA y DHB, 50 µg de c/u por placa, e histidina a 0.1 mM, para la identificación de las autotrofas de las diferentes cepas. La concentración de los antibióticos utilizados como medio de selección fueron: cloramfenicol 10 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml y kanamicina 30 µg/ml. El medio de cultivo SOC se utilizó para la recuperación de bacterias después de la electroporación.

Purificación de plásmidos:

- 1.- Se inoculan 5 ml de LB, que contengan antibiótico, con una colonia de la bacteria MC1061 y se crece a la temperatura permisible (29°C) y en agitación durante toda una noche
- 2.- Tomar 400 µl del cultivo anterior e inocularlos en un matraz con 40 ml de LB con antibiótico y crecer hasta D.O.₆₀₀ = 1. En ese momento se agrega cloramfenicol a una concentración final de 100 µg/ml (para amplificar el plásmido) y se deja incubando el cultivo 12 horas más.
- 3.- Se colectan las células centrifugando a 6000 rpm a 4°C durante 10 min.
- 4.- Resuspender el pellet en 200 µl de buffer glucosa/tris/EDTA, homogenizar y transferir a tubos eppendorf de 1.5 ml.
- 5.- Adicionar 50 µl de glucosa/tris/EDTA conteniendo 25mg/ml de lisozima, mezclar suavemente y dejar a temperatura ambiente por 10 min.
- 6.- Adicionar 500 µl de solución fresca de NaOH/SDS, mezclar suavemente y dejar en hielo por 10 min.
- 7.- Adicionar 375 µl de Acetato de potasio 3 M, mezclar suavemente y dejar 10 min. en hielo.
- 8.- Centrifugar por 10 min, a 4°C a 13000 rpm.
- 9.- Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio, agregar 25 µl de RNAsa de un stock 1 mg/ml (concentración final 20 µg/ml), incubar a 37°C durante una hora.
- 10.- Agregar dos volúmenes de etanol absoluto (dividir en dos tubos), mezclar por inversión y dejar 15 min en hielo seco.
- 11.- Centrifugar 15 min, a 10000 rpm.

- 12.- Lavar el pellet con etanol al 70%
- 13.- Secar en el Savant y resuspender en 100 µl de agua.
- 14.- Extraer 3 veces con igual volumen de la mezcla fenol-cloroformo-álcool isoamílico en proporción 25:24:1, agitar en vortex por 3 min y centrifugar durante 3 min.
- 15.- Tomar la fase acuosa y precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto mas 1/10 del volumen de acetato de sodio 2M.
- 16.- Dejar en hielo seco 15 min y centrifugar 15 min a 10000 rpm.
- 17.- Lavar pellet con alcohol al 70 % y secar en savant
- 18.- Resuspender en 30 µl de buffer TE.

Purificación de DNA Total:

- 1.- Crecer un cultivo de 10 ml hasta una O.D.₆₀₀ = 1.
- 2.- Recuperar las bacterias por centrifugación y lavar dos veces con una solución NaCl 100 mM, Tris pH 7.9 a 10 mM y EDTA pH 7.9 10 mM.
- 3.- Resuspender en 100 µl de una solución NaCl 150 mM y EDTA pH 7.9 100 mM.
- 4.- Adicionar lisozima a una concentración final de 0.25 mg/ml, incubar a 37°C. durante 20 min.
- 5.- Adicionar 200 µl de la solución Tris pH 7.9 100 mM, NaCl 100 mM y SDS al 2%. Mezclar invirtiendo el tubo e incubar a 65°C. durante 30 min.
- 6.- Extraer 4 veces con igual volumen de la mezcla Fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1).
- 7.- Adicionar dos volúmenes de etanol absoluto frío.
- 8.- Tomar el DNA con asa de vidrio, pasar a otro tubo y secar en savant.
- 9.- Resuspender en 300 µl de buffer TE.

Todas las reacciones con enzimas de restricción, polimerasas y ligasas se realizaron siguiendo las recomendaciones en los catálogos de los fabricantes (Biolabs o Promega) para obtener las condiciones óptimas de reacción.

Geles para electroforesis

Se utilizó buffer E (Maniatis, 1985) para preparar todos los geles de agarosa y también como buffer de corrida. Para los geles analíticos se utilizó agarosa normal al 0.8%, se hacia migrar el DNA a 100 volts, se tiñeron con bromuro de etidio (BrEt) y se observaron con luz ultravioleta de onda corta. En los geles preparativos se utilizó agarosa de bajo punto de fusión al 1 o al 1.2%, se tiñeron con BrEt y se observaron con luz ultravioleta de onda larga (para no dañar el DNA), y la banda de interes se cortaba con bisturf para recuperar el DNA.

Recuperación de DNA a partir de bandas de geles.

Para recuperar el DNA de las bandas de agarosa se utilizaron dos métodos:

- a) el de extracción por fenol-cloroformo y,
- b) el método comercial de 'Gene Clean', el cual dió mayor eficiencia en la recuperación
 - a) El método de extracción con fenol-cloroformo consistió en lo siguiente
 - 1.- Colocar el trozo de agarosa con la banda de DNA en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
 - 2.- Agregar buffer TE hasta tener un volumen total de 400 ul.
 - 3.- Agregar 1 µl de RNAt 10uM, y calentar a 65°C de 5 a 10 min hasta que se disuelva la agarosa

- 4.- Agregar un volúmen igual de fenol, agitar en el vortex 3 min y centrifugar en la centrífuga eppendorf durante 3 min.
- 5.- Repetir extracción con fenol una vez y otra vez con cloroformo.
- 6.- precipitar DNA con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 del volúmen de NaCl 2 M, Poner en hielo seco durante 15 min.
- 7.- Centrifugar durante 15 min y desechar el sobrenadante
- 8.- Resuspender pellet en 200 μ l de Acetato de amonio 0.1 M, añadir 0.5 ml de etanol absoluto, congelar en hielo seco 15 min.
- 9.- centrifugar 15 min y desechar sobrenadante.
- 10.- Lavar el pellet con etanol frío al 70% y secar pellet en savant.
- 11.- Resuspender en \sim 100 μ l de agua.

b) El método de 'Gene Clean' es el siguiente

- 1.- Calentar la agarosa sólo lo necesario para que funda y no dejarla mucho tiempo a alta temperatura.
- 2.- Agregar de 2.5 a 3 volúmenes de la solución stock de NaI y mezclar
- 3.- Agregar la suspensión de 'Glass milk' (se agregan 5 μ l, a una solución que contenga 5 μ g de DNA o menos, adicionar 1 μ l de suspensión por cada 0.5 μ g de DNA arriba de 5 μ g), se mezclan bien y se incuba por 5 min en hielo (el DNA se pega a la matriz de sílica que tiene el glassmilk).
- 4.- Centrifugar el complejo DNA-glassmilk con un pulso de 5 segundos en la centrífuga eppendorf, y remover el sobrenadante.
- 5.- Lavar 3 veces el pellet con \sim 1 ml. de la solución NEW cada vez.
- 6.- Al pellet de DNA-glassmilk se le agrega 5 μ l de buffer TE para cluir al DNA, se incuba esto a 45-55°C por 2 o 3 min.
- 7.- Se centrifuga por 30 segundos y se recupera el sobrenadante en otro tubo limpio. Al pellet se le repite el paso 6 y al final se juntan los dos volúmenes del sobrenadante.

Transformación de células MC1061

A) Preparación de células competentes.

- 1.- Inocular un cultivo de LB con 1/100 del volúmen de un cultivo de MC1061 en fase estacionaria.
- 2.- Crecer a 37°C hasta alcanzar una O.D.₆₀₀ = 1 (\sim 8x10⁸ ccl/ml)
- 3.- Enfriar las células en hielo 10 min
- 4.- Centrifugar 10 min a 8000 rpm
- 5.- Tirar el sobrenadante y resuspender las células (pipeteando o por inversión) en 1/10, del volumen inicial del cultivo, de CaCl₂ 0.1 M frío.
- 6.- Dejar en hielo 20 min
- 7.- Centrifugar las células 5 min a 8000 rpm
- 8.- Tirar el sobrenadante y resuspender en 1/100, del volumen inicial del cultivo, de CaCl₂ 0.1 M, frío
- 9.- Pipetear alícuotas de 50 μ l en tubos eppendorf.

B) Transformación.

- 1.- Tomar una muestra de 50 μ l de células competentes y agregar 0.9 ml de CaCl₂ 0.1 M frío y la cantidad de DNA (plásmido) de acuerdo a la eficiencia de transformación de las células con cada plásmido; revolver y dejar en hielo 30 min.
- 2.- Dar un pulso de "heat shock" a 43.5 °C durante 45 seg
- 3.- Agregar 10 ml de LB e incubar a la temperatura permisiva 29 o 37°C durante 30-60 min
- 4.- Centrifugar 5 min a 8000 rpm
- 5.- Resuspender el pellet en 200 μ l de LB
- 6.- Sembrar 9/10 y 1/10 de la transformación en cajas de LB+antibiótico, incubar a la temperatura permisiva

Transformación de *Salmonella typhimurium* SL5283:

- 1.- Crecer 2 ml de LB con SL5283 a 37°C durante toda la noche
- 2.- Añadir los 2 ml crecidos a 30 ml de LB estéril
- 3.- Crecer con agitación ~2 horas y medir la densidad óptica, cuando el cultivo alcance $O.D_{550} = 0.4-0.6$ parar el crecimiento poniendo el matraz sobre hielo
- 4.- Centrifugar las células durante 8 min a 3000 rpm y tirar el sobrenadante
- 5.- Resuspender el pellet suavemente en 15 ml de $CaCl_2$ 0.1 M/Tris 10 mM pH 7.5 frío y dejar 10-15 min sobre hielo.
- 6.- Repetir paso 4.
- 7.- Resuspender suavemente en 2 ml de $CaCl_2$ /Tris y dejar 30 min sobre hielo
- 8.- Pasar 200 μ l a tubos eppendorf de 1.5 ml, añadirle la cantidad deseada de plásmido y dejar en hielo 30 min
- 9.- Meter el tubo en agua a 42°C durante 1 min e inmediatamente pasarlo a hielo (4°C) por 1 min
- 10.- Añadir 800 μ l de LB e incubar a la temperatura permisible durante 90 min
- 11.- Platear distintas diluciones, de acuerdo a la eficiencia esperada, en cajas con medio selectivo e incubar a la temperatura permisible durante 14-18 horas.

Obtención de fago P22 transducente:

- 1.- Crecer transformantes de SL5283 en 2 ml de LB+antibiótico que contenga galactosa al 0.1% y glucosa al 0.1% a la temperatura permisiva y con agitación durante toda la noche
- 2.- En un matraz con 30 ml de LB+antibiótico+glucosa+ galactosa añadirle 100 μ l del cultivo del paso anterior y 100 μ l de una preparación de fago que tiene 2×10^8 ufp/ml. La relación final recomendable es 0.01-0.1 fagos/célula (Davis R.W *et al* 1982).
- 3.- Dejar incubando de 14 a 18 horas.
- 4.- Centrifugar 5 min a 5000 rpm
- 5.- Recuperar el sobrenadante esterilmente y, en tubos de vidrio, añadir 1/10, de volumen, de cloroformo a cada tubo.
- 6.- Agitar en el vortex 3 min, repetir la agitación 3-4 veces durante la primera hora y después dejar reposar a temperatura ambiente durante 12 horas.
- 7.- guardar a 4°C

Titulación del fago P22:

- 1.- En 2 ml de LB inocular la cepa SL5235 y crecer toda la noche a 37°C
- 2.- A tubos con 2 ml de LB agregar 20 μ l de una solución de $CaCl_2$ 100 mM / Tris 10 mM pH 7.5 y 100 μ l del cultivo anterior, incubar a 37°C hasta una $D.O_{550} = 0.4 - 0.6$
- 3.- Mientras tanto se debe tener preparado el siguiente material:
 - i) Tubos con 2.5 ml de LB suave con 20 μ l de $CaCl_2$ /Tris; fundirlos y mantenerlos a 47°C
 - ii) Cajas de Petri con LB sólido estéril, tenerlas listas a 37°C
 - iii) Preparar diluciones del fago: 1/1, 1/100, 1/10⁴, 1/10⁶, diluir con LB/ $CaCl_2$ /Tris
- 4.- Tomar 200 μ l del cultivo de SL5235 del paso 2 y mezclarlos con 200 μ l de la dilución del fago, agitar suavemente y dejar incubando 30 min a 37°C sin agitación
- 5.- Tomar 200 μ l de la mezcla anterior y añadirlo a uno de los tubos que contienen LB suave a 47°C, rápidamente agitar en el vortex 2 o 3 seg y en seguida verter esta mezcla sobre una caja de LB, de las que estaban previamente a 37°C, cuidando de quede bien esparcida. Después de eso no mover la caja durante una hora. Todos estos pasos deben ser rapidísimos y en esterilidad (se hace lo mismo para cada una de las diluciones de fago).

- 6.- Incubar las cajas de 8 a 12 horas a 37°C Al cabo de este tiempo contar el número de placas formadas.

Controles: Hacer lo mismo mezclando

- a) 200 µl de bacterias + 200 µl de LB solo
- b) 200 µl de LB solo + 200 µl del fago
- c) 200 µl de Bacterias + 200 µl de un fago de título conocido

Obtención de transductantes de SL3261:

- 1.- Crecer la cepa SL3261 en 2 ml de LB a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria
- 2.- Añadir 100 µl de este cultivo a 2 ml de LB/CaCl₂/Tris y crecer hasta O.D.₃₃₀ = 0.4 -0.6
- 3.- Tomar entre 0.5 y 1 ml de este cultivo y verterlo sobre cajas de petri con LB+medio selectivo (en este caso tetraciclina) a que cubra perfectamente la superficie del medio sólido, quitar el exceso.
- 4.- Dejar secar la caja (abierta junto al mechero o en campana de flujo laminar).
- 5.- Hacer diluciones de fago transductante 1/1, 1/10, 1/100 y 1/1000, en LB/CaCl₂/Tris
- 6.- Tomar 20 µl de cada dilución del fago transductante y poner cuidadosamente en la superficie ya seca de las cajas descritas en el paso 3.
- 7.- Dejar secar también las gotas a temperatura ambiente; llevar a 37°C. y esperar a que aparezcan colonias.
- 8.- Las transductantes obtenidas estriarlas sobre medio selectivo.

Controles:

- a) Poner gotas de diluciones del fago sobre el medio con medio selectivo pero sin cesped previo.
- b) Hacer un cesped de SL3261 sobre medio no selectivo y poner las gotas con fago.
- c) Cesped de SL3261 sobre medio selectivo agregando gotas de alguna preparación de fago transductante que ya se haya provado con anterioridad.

Ensayo para probar termosensibilidad

- 1.- Crecer la cepa con plásmido termosensible que se desee probar en 5 ml LB+Km a 29°C hasta fase estacionaria
- 2.- Hacer una dilución 10⁶ e inocular en 10 ml LB sin antibiótico. Platear diluciones para calcular el número de bacterias inoculado (punto T₀)
- 3.- Incubar a 29°C durante -4.0 horas
- 4.- Dividir el cultivo en dos porciones de 5 ml c/u, una se continua incubando a 29° y otra se pasa a 42° Platear diluciones del cultivo (punto T₁)
- 5.- Cuando cada uno de los cultivos alcanza una O.D.₆₀₀ = 1 sembrar diluciones (punto T₂)

- 6.- Cada una de las diluciones en los tres puntos a 29° y a 42°C se platean tanto en LB solo como en LB+Km y se crecen a la temperatura permisible; se cuentan las colonias, el número de bacterias que crecen en LB solo, nos da el número de bacterias totales en el cultivo y las que crecen en LB+Km nos dan idea de cuantas tienen el plásmido; luego se compara la pérdida de plásmido a lo largo del crecimiento en la temperatura permisiva y en la temperatura restrictiva.

Este ensayo se hizo con las cepas MC1061, SL5283 y SL3261.

Selección de Dobles recombinantes de SL3261

Se inoculan 5 ml de LB+Tc con colonias transducentes con el plásmido T'-HisG-Tc' y se crece a la temperatura permisiva hasta la fase estacionaria. Se toman 100 µl de este cultivo (~1x10⁸ bacterias) y se inoculan en un matraz con 50 ml de LB solo; se crece a la temperatura restrictiva para curar del plásmido. Al final del crecimiento se toman diluciones para seleccionar las dobles recombinantes.

Para la selección se utilizó la técnica de platear con réplicas, que consiste en crecer las colonias en un medio con condiciones permisivas, y replicarlas luego a cajas de medios con diferentes antibióticos, para observar el comportamiento de cada colonia en los distintos antibióticos. Una colonia doble recombinante que además haya perdido al plásmido solo tendrá resistencia a tetraciclina y no a kanamicina ni a cloramfenicol.

Southern

La transferencia de los fragmentos de restricción del DNA genómico de las posibles dobles recombinantes, desde el gel de agarosa hasta una membrana de nitrocelulosa se realizó básicamente siguiendo el método de transferencia por capilaridad descrito en Maniatis *et al.* 1989. El marcaje de las sondas de reconocimiento se realizó mediante 'Nick translation', y las condiciones de prehibridación fueron las siguientes:

- 1.- Se preparan 10 ml de una solución de 2.5 ml de SSPE 20X, 5.0 ml de Formamida, 0.1 ml Denhardt 100X (2 g de polivinilpirrolidona, 2 g de ficoll y 2 g de BSA, todo en 100 ml de agua), 0.30 ml de SDS 10%, 0.1 ml de DNA de salmon (10 mg/ml) y se agrega la cantidad suficiente de agua para completar los 10 ml
- 2.- Las membranas de nitrocelulosa se prehibridan con la solución anterior durante un tiempo mínimo de tres horas a 43°C
- 3.- Después de este tiempo se agrega la sonda previamente desnaturalizada y se incuba a la misma temperatura durante 12 horas.
- 4.- Se lavan las membranas una vez con SSPE 2X y cuatro veces con SSPE 0.2X y se exponen ante una película sensible.

'Nick Translation'

Esta técnica se utilizó para marcar radioactivamente las sondas de detección por hibridación y el marcador de peso molecular (larnda EcoRI/HindIII). Las sondas marcadas fueron el gene de tetraciclina de aproximadamente 2000 pares de bases y un segmento del gene *hisG* de 1990 pares de bases.

- 1.- Preparar la siguiente mezcla de reacción:

300 ng de DNA ya sea Tc o *hisG* en un volumen de 3 o 4 ul
1.5 µl de buffer 10X N.T.
1.5 µl 0.2 mM dCTP, dGTP y dTTP
0.375 µl DNAsaI de una dilución 1/50000 de una solución de 1 mg/ml
2.0 µl dATP³² > 3000 Ci/mmol
1.0 µl DNA pol.I de *E. coli*.

_____ Suficiente volumen de agua para completar 15 ul en total

15.0 µl Total

- 2.- Incubar a 14°C durante tres horas
- 3.- Parar reacción con 15 µl de NT stop 2X (EDTA 20 mM, SDS 0.2% y 250 µg de DNA carrier
- 4.- Añadir un volumen (30 µl) de acetato de amonio 4 M + 4 volúmenes (120 µl) de etanol absoluto. Poner en hielo seco 15 min

- 5.- Centrifugar 10 min en eppendorf
- 6.- Resuspender pellet en 20 μ l de agua + 1 volúmen de acetato de amonio 4 M + 4 vol de etanol absoluto. Enfriar a -70 por 15 min y centrifugar 10min
- 7.- Resuspender en 50 μ l de buffer TE
- 8.- Tomar 1 μ l y contar la radioactividad en contador de centelleo para determinar la cantidad necesaria para usar en la hibridación
- 9.- Cada sonda antes de ser usada para hibridar se debe desnaturalizar, para ello se le añade 1/10 del volumen de NaOH 1 M se deja 10 min a temperatura ambiente y al final se neutraliza la reacción agregando 1/10 del volumen de una solución con Tris-HCl 1.8 M/Tris-Base 0.2 M a un pH de 7.5

Construcción del plásmido pSus Tc'

La construcción del plásmido que a continuación se describe fue realizada por Susana Castro en este laboratorio. Ya que el plásmido pSus Tc' es el precursor inmediato del plásmido que utilice en los experimentos de doble recombinación, y que su construcción no esta descrita en ningún otro lado, lo incluyo en esta sección de material y métodos.

La región de *hisG* se obtuvo a partir del operón de histidina de *S. typhimurium* contenido en el fago M-13 Hol76, como un fragmento de restricción *BglII-EcoRI* de 2535 pb (Fig 1). Este fragmento, el cual incluye parte del gene *hisG* y del gene *hisD*, se clonó en el vector pMT21, que codifica para la resistencia a ampicilina, linearizado previamente en el sitio de *SmaI*. El plásmido pSus resultante tiene un tamaño de 4433 pb. (Fig. 1).

El gene de tetraciclina se obtuvo del plásmido pHP45 Ω -Tc (Fellay, R. *et al.* 1987), como un fragmento *HindIII* de 2000 pb. El plásmido pSus se corto con *PvuII*, que se encuentra en la parte media de la región de *hisG* y en ese sitio se introdujo el gene de tetraciclina (Fig 1), obteniéndose el plásmido pSusTc (Fig. 2).

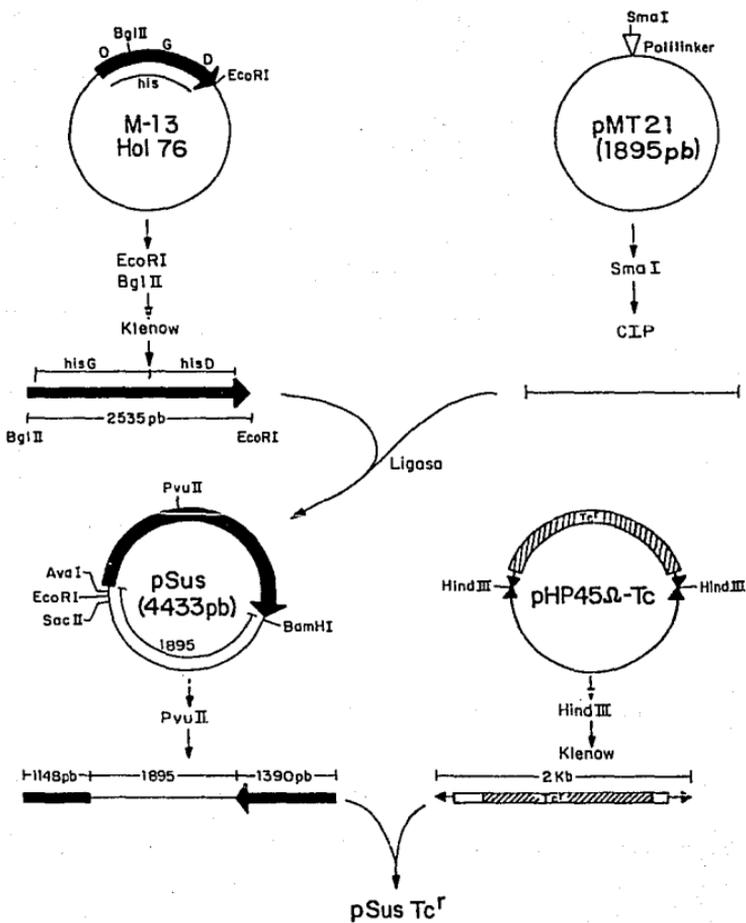


Fig 1

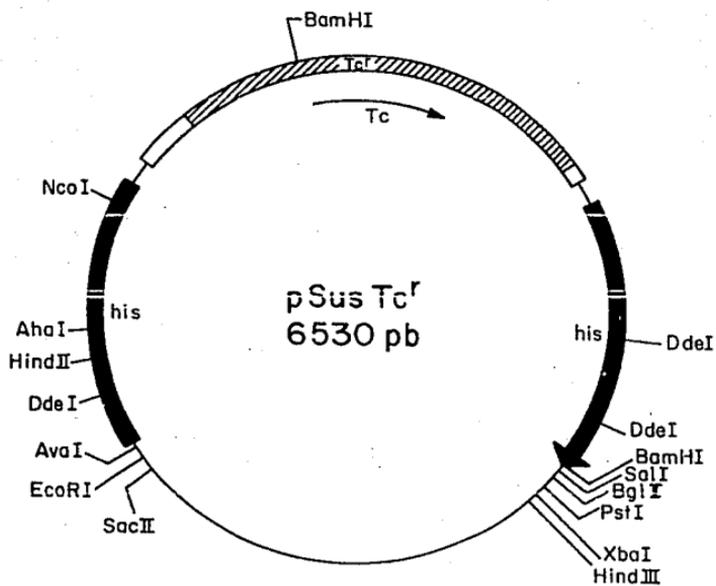


Fig 2

RESULTADOS

CONSTRUCCION DEL PLASMIDO (T^r-hisG-Tc^r)

Para construir el plásmido (T^r-hisG-Tc^r), el fragmento de DNA que contiene el gene de resistencia a tetraciclina, flanqueado por secuencias de *hisG* de *S. typhimurium*, se escindió del plásmido pSusTc^r (ver material y métodos) cortando el plásmido con *EcoRI*, rellenando el extremo cortado y, cortando subsecuentemente con *BglII*.

Este segmento se clonó en el plásmido termosensible pHSG415 el cual tiene los genes de resistencia a cloranfenicol, kanamicina y ampicilina (Hashimoto-Gotoh, T. *et al.* 1981). Para la clonación, el plásmido pHSG415 fue cortado con *BamHI* y *HincII*, desechando un segmento de aproximadamente 700 pb, lo cual produce la inactivación de la resistencia a ampicilina. Durante la reacción de ligasa del vector con el inserto el extremo de *HincII* del vector se une al extremo rellenado de *EcoRI* del inserto y, el extremo de *BamHI* es complementario con el extremo que deja *BglII* (Fig. 3)

El plásmido resultante es el T^r-hisG-Tc^r de ~11.1 Kb, el cual codifica para la resistencia a kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina (fig. 4). El gene de tetraciclina esta flanqueado por regiones de *hisG*, una de ~1145 pb, y otra de ~1390 pb. Esta construcción fue realizada en *E. coli*.

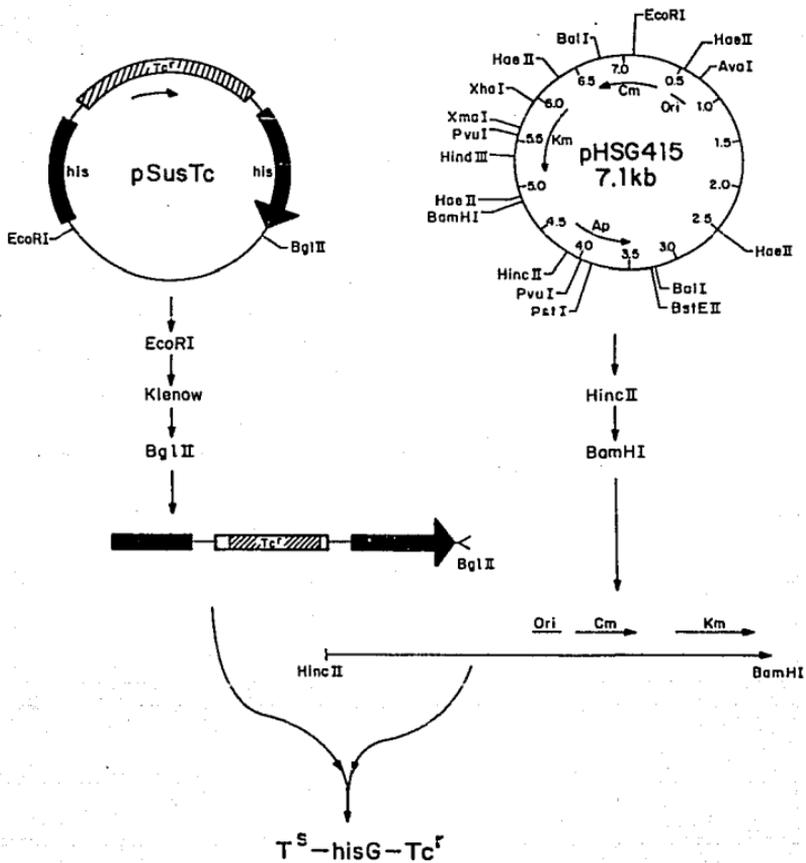


Fig 3

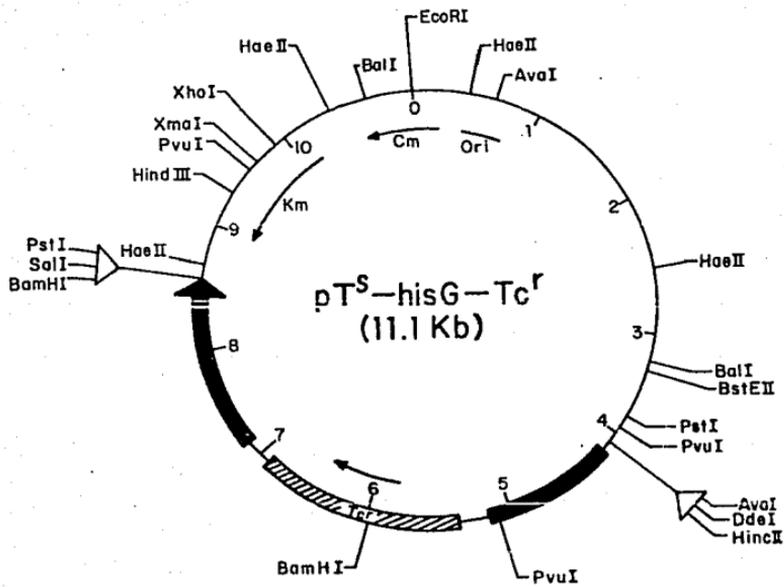


Fig 4

TERMOSENSIBILIDAD DEL PLÁSMIDO T⁺-hisG-Tc^r EN *E. coli*.

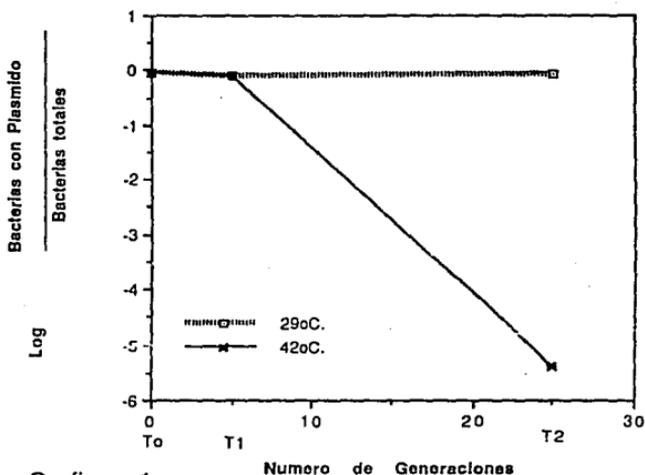
La estabilidad en *E. coli* del plásmido construido, se evaluó a 29°C y 42°C. Como puede observarse en la gráfica 2, la replicación del plásmido T⁺-hisG-Tc^r sigue siendo termosensible, al igual que la replicación del plásmido original pHSG415 (gráfica 1). Después de 25 generaciones de crecimiento aproximadamente solo 1 de cada 10⁴ bacterias mantienen el plásmido cuando el cultivo se crece a 42°C.

TRANSFORMACION DE *S. typhimurium* SL5283

La introducción directa de plásmidos aislados de *E. coli*, a cepas de *S. typhimurium*, presenta el problema que los sistemas de modificación-restricción de las dos bacterias son diferentes, lo que implica que el DNA introducido sería degradado. Para resolver este problema el plásmido T⁺-hisG-Tc^r se transformó primero en la cepa SL5283 de *S. typhimurium*, la cual es modificación⁺, restricción⁻ (m⁺, r⁻), esto es, es capaz de modificar al DNA introducido pero tiene inactivo su sistema de restricción. A las bacterias transformantes obtenidas se le confirmó el patrón de resistencia a antibióticos y el tamaño del plásmido.

Los resultados del ensayo de termosensibilidad para la cepa SL5283 con el plásmido control pHSG415 se muestran en la gráfica #3, y con el plásmido construido T⁺-hisG-Tc^r en la gráfica #4.

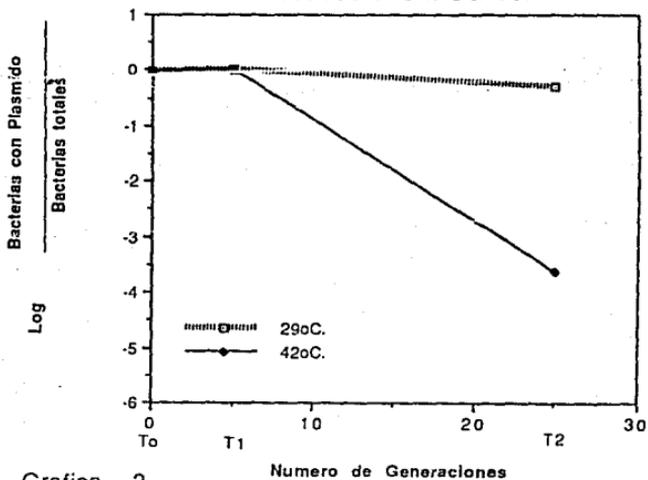
MC1061/pHSG415



Grafica.- 1

Cinética de Segregación del plásmido pHSG415 en la cepa MC1061 a 29°C. y 42°C. realizada de acuerdo al ensayo de termosensibilidad descrito en material y métodos. El tiempo de generación estimado a 29°C. fue de 55 min. y para 42°C. fue de 30 min.

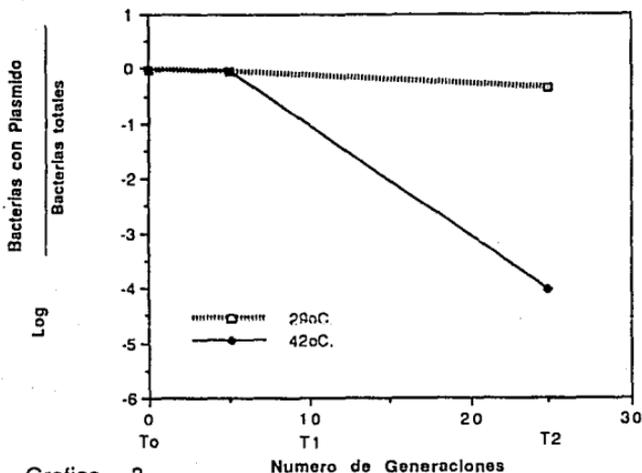
MC1061/Ts-hisG-Tcr



Grafica.- 2

Cinética de Segregación del plásmido Ts-hisG-Tcr en la cepa MC1061 a 29°C. y 42°C. realizada de acuerdo al ensayo de termosensibilidad descrito en material y métodos.

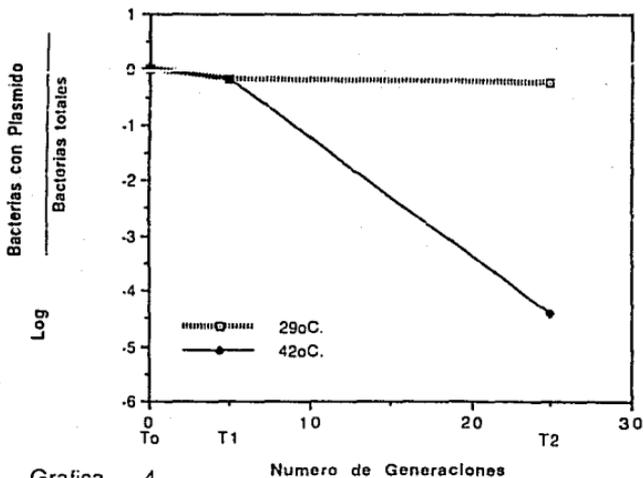
SL5283/PHSG415



Grafica.- 3

Cinética de Segregación del plásmido **PHSG415** en la cepa SL5283 a 29°C. y 42°C. realizada de acuerdo al ensayo de termosensibilidad descrito en material y métodos.

SL5283/Ts-HisG-Tcr



Grafica.- 4

Cinética de Segregación del plásmido **T^s-HisG-Tcr** en la cepa SL5283 a 29°C. y 42°C. realizada de acuerdo al ensayo de termosensibilidad descrito en material y métodos.

TRANSDUCCION A *S. typhimurium* SL3261 (*aroA*, *hisG*).

Debido a que la cepa *aroA*, *hisG* de *S. typhimurium* SL3261 se puede transformar con muy baja eficiencia, el plásmido proveniente de SL5283 se introdujo a SL3261 por transducción generalizada, utilizando el fago P22. Las cepas transductantes se seleccionaron primeramente por su resistencia a tetraciclina, y las colonias que crecieron se replicaron en medio con cloranfenicol y kanamicina. Sólo se obtuvieron tres colonias resistentes a los tres antibióticos, en dos de ellas se comprobó que tenían deleciones en regiones del plásmido que involucraban a las secuencias de *hisG*, esto se hizo mediante el análisis de sus patrones de restricción. Debido a problemas para purificar DNA de plásmido a partir de las cepas de *Salmonella*, el patrón de restricción de los plásmidos presentes en las clonas obtenidas se obtuvo transformando la cepa de *E. coli* MC1061 con DNA total de las clonas transductantes y posteriormente aislando los plásmidos de *E. coli*.

TERMOSENSIBILIDAD DEL PLASMIDO T^r-hisG-Tc^r EN *S. typhimurium*

Como puede observarse en las gráficas 3 y 4, tanto el plásmido original pHSG415 como el plásmido T^r-hisG-Tc^r se comportan de manera semejante en la cepa SL5283 de *S. typhimurium* y en *E. coli* MC1061, viéndose claramente afectada su replicación al cambiar las bacterias a la temperatura no permisiva. Sin embargo, esta termosensibilidad es bastante menos marcada en la cepa SL3261 de

S. typhimurium (Gráfica 5), donde después de 25 generaciones de crecimiento a 42°C, aproximadamente el 1% de las bacterias en la población todavía mantienen el plásmido.

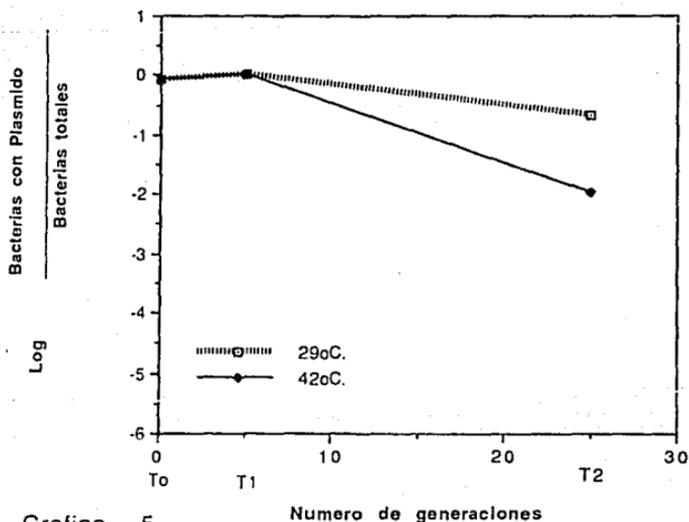
GENERACION DE DOBLES RECOMBINANTES EN SL3261

La cepa SL3261 transducida con el plásmido T⁺-hisG-Tc^r fue crecida a la temperatura permisible y en ausencia de antibiótico, hasta alcanzar la saturación del cultivo (D.O.₆₀₀ ~1.5).

Aproximadamente 10⁸ células de este cultivo a saturación se utilizaron para inocular un segundo medio de cultivo en ausencia de antibiótico, el cual se creció ahora a la temperatura restrictiva (42°C) durante ~20 generaciones para favorecer la dilución del plásmido en la población.

Para seleccionar las candidatas dobles recombinantes, se tomaron diluciones del segundo crecimiento y se sembraron en presencia de tetraciclina y las colonias que crecieron fueron replicadas en cloranfenicol y kanamicina. Utilizando este método de búsqueda de dobles recombinantes no pudimos detectar ninguna colonia que sólo fuera resistente a tetraciclina, i.e., todas las colonias analizadas mostraron ser resistentes a los tres antibióticos. Por ello, para continuar la búsqueda de las dobles recombinantes hicimos modificaciones al protocolo básico para la selección, que incluyeron fundamentalmente cambios en el número de pases dados a la temperatura no permisiva (hasta 5 pases), inoculando cada vez cuando menos

SL3261/Ts-hisG-Tc^r



Grafica.- 5

Cinética de Segregación del plásmido T^s -hisG-Tc^r en la cepa SL3261 a 29°C. y 42°C. realizada de acuerdo al ensayo de termosensibilidad descrito en material y métodos.

con 10^8 bacterias del pase anterior. También se evaluó la ventaja de tener presente o ausente tetraciclina en los pases, así como diferentes temperaturas de crecimiento.

Finalmente no encontramos ninguna colonia que tuviera claramente el patrón de resistencia a anti-bióticos esperado para una doble recombinante; todas las bacterias analizadas que eran resistentes a tetraciclina resultaron también resistentes a los otros dos anti-bióticos. Solo hubo el caso de algunas colonias que mostraban un crecimiento mucho más lento en Km y en Cm y un crecimiento normal en tetraciclina, como las cepas SL1 y SLb obtenidas después de un cultivo que llevaba 5 pases

El DNA cromosomal de algunas bacterias que presentaban este comportamiento sospechoso se analizó por el método de Southern, utilizando los genes de tetraciclina, el de *hisG* y el plásmido completo pHSG415 como sondas de detección, esperando poder distinguir si el plásmido se encontraba aún independiente del cromosoma o si se encontraba todo integrado como resultado de un evento de recombinación sencilla (Fig. 5). Estos resultados se muestran más adelante.

ELECTROPORACION DE SL3261

Como una estrategia alternativa para lograr la doble recombinación del plásmido T-*hisG*-Tc', se intentó transformar a la cepa SL3261 con un fragmento lineal del plásmido que sólo tuviera el gene de Tc flanqueado por las secuencias

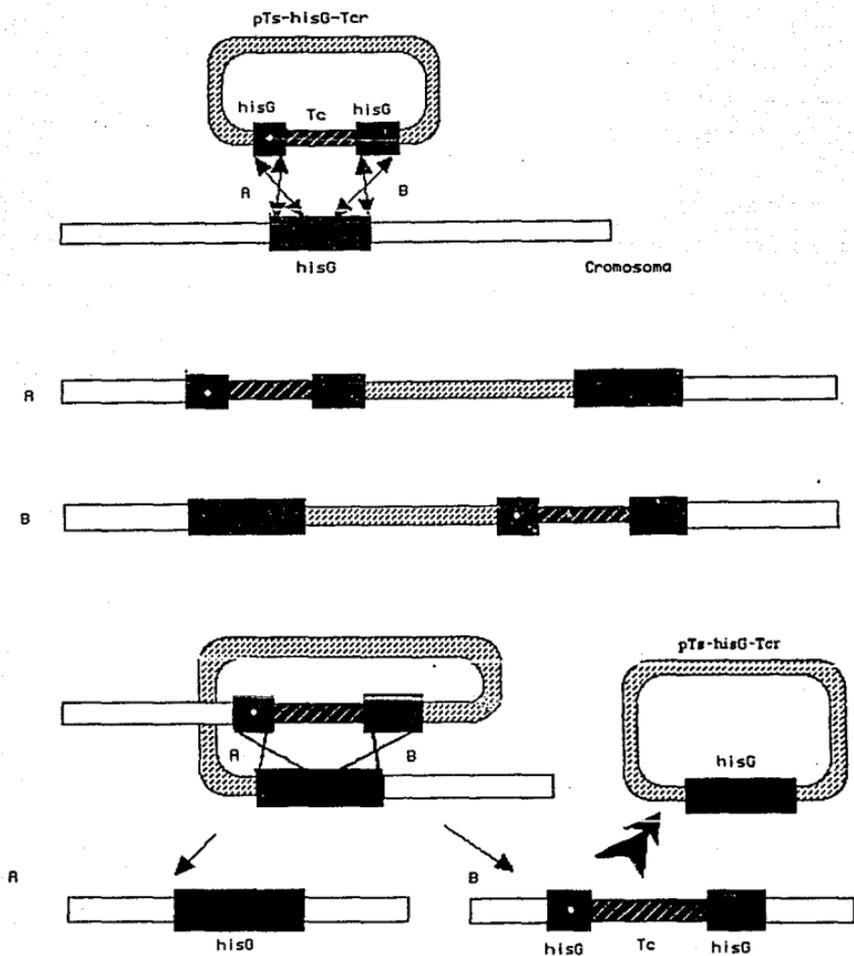


Fig.- 5 Representación esquemática de los eventos que ocurren en un proceso de doble recombinación.

de *hisG*. Este fragmento de ~4,800 pb se obtuvo del plásmido T⁺-*hisG*-Tc^r cortando con la enzima *Pst*I. El DNA se introdujo por electroporación y las colonias transformantes se seleccionaron en un medio con tetraciclina. Bajo estas condiciones de transformación con DNA lineal la resistencia a tetraciclina no se puede expresar de manera estable a menos que el gene de tetraciclina sea incorporado al cromosoma por doble recombinación en las regiones de *hisG* que lo flanquean.

Como resultado de este experimento obtuvimos unas colonias que presentaban un crecimiento lento en el antibiótico. De estas colonias analizamos por Southern tres (SLAe^r, SLBe^r y SLCe^r) que consideramos las mejores candidatas

HIBRIDACION TIPO SOUTHERN

El DNA de las cepas SL1, SL2, SLAe^r, SLBe^r y SLCe^r se preparó para detectar el sitio donde se encontraba el gene de resistencia a tetraciclina. Hay tres formas posibles en las que este gene puede estar:

- i.- Como gene integrado a la region *hisG* como resultado de una doble recombinación, tal como lo esperabamos.
- ii.- Que el plásmido esté totalmente integrado al cromosoma como resultado de un evento de recombinación sencilla.
- iii.- Que el gene este formando parte del plásmido aún como elemento extracromosomal.

Aún más, podemos imaginar estas mismas posibilidades pero combinadas dentro de una sola bacteria. Es más en el caso de que el plásmido completo este integrado, debemos tomar en cuenta que puede adoptar dos posibles acomodos (fig.5).

Para saber si ocurrió una integración en la región cromosomal de *hisG* lo más fácil es digerir con enzimas de restricción que corten en sitios conocidos de esa región (conocemos el patrón de restricción de una región de 3768 pb que corresponde a los genes *hisOGD* cromosomales de *S. typhimurium*). Luego podemos separar las bandas en un gel e hibridarlas con el segmento de *his* que tenemos clonado, marcado radioactivamente. Se observan y se comparan las diferencias entre el tamaño de la banda de *his* de la cepa SL3261, de la cual partimos, y las de las cepas que estamos probando. En el caso de haber algún incremento de tamaño, entonces se busca si esto corresponde al tamaño del gene de tetraciclina o al del plásmido completo.

La digestión del DNA genómico se realizó con *HindIII* o *BglII*. *HindIII* corta aproximadamente en la base 3120 de la región de *hisOGD* (ver fig. 6) y, además corta al plásmido en un solo sitio. *BglII* corta en los primeros 100 pb de *his* y no corta al plásmido.

Para el caso de estas dos enzimas, considerando la opción (i) mencionada, sólo esperamos un incremento en la banda cromosomal de *his*, equivalente al tamaño del gene de Tc, de aproximadamente 2000 pb. Para la opción (ii) hay dos posibilidades, dependiendo del acomodo del plásmido (fig. 6), así, para el caso de

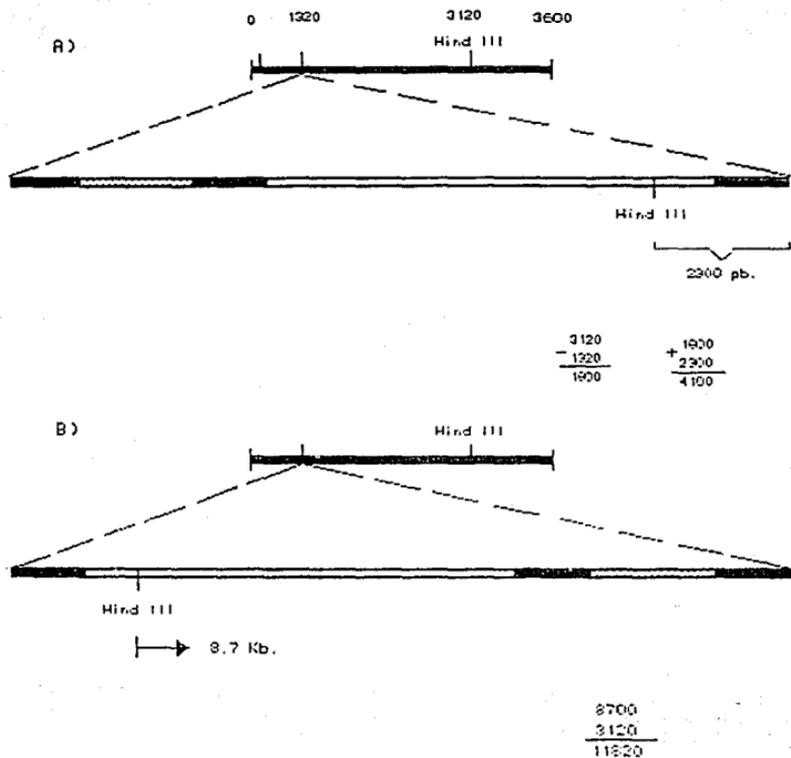


Fig.- 6 Muestra las dos posibles orientaciones del plasmido Ts-HisG-Tcs cuando se encuentra integrado al cromosoma.

HindIII, esperamos una banda de 4.1 Kb, o bien una de 9.5 Kb. Para el caso de *BglIII*, como no corta dentro del plásmido, sólo esperamos un incremento en el tamaño de la banda de *his*, correspondiente a 11.1 Kb.

Para la opción (iii) esperamos dos señales por separado, una del plásmido linearizado al cortar con *HindIII*, o bien, superenrollado cuando se usa *BglIII*, y la señal de la banda cromosomal que se debe observar con cualquiera de las dos enzimas. También se realizaron hibridaciones con el gene de tetraciclina para complementar mejor el análisis de los resultados.

En la fig. 7.I se observa el resultado de una primera hibridación. Se puede ver la señal de la banda de *his* cromosomal en la cepa control SL3261 (carril 9). Esta banda oscila entre los 5000 pb al cortar con *Hind III*, y los 6000 pb para el caso de *BglIII*. Para las 3 cepas obtenidas por electroporación (carriles 5, 6 y 7) al digerirse con la enzima *Hind III*, se observa un incremento del tamaño esperado de las bandas de la región *his* cromosomal, sin embargo este aumento no parece ser mayor de 1000 pb. La cepa del carril 1 no se puede analizar bien por la sobreexposición, pero en el carril H 2 se puede observar una señal fuerte que, muy probablemente corresponde al plásmido linearizado y una señal más débil que corresponde al DNA cromosomal la cual está desplazada un poco hacia arriba. Estos resultados parecían atractivos, sin embargo, analizando lo que sucede cuando se hibridan las mismas bandas con el gene de tetraciclina (fig. 7.II), observamos que en los carriles 5, 6 y 7 no hay señal de tetraciclina. Para el caso de la cepa del carril B.2 solo se ve la señal en la banda superior que corresponde al

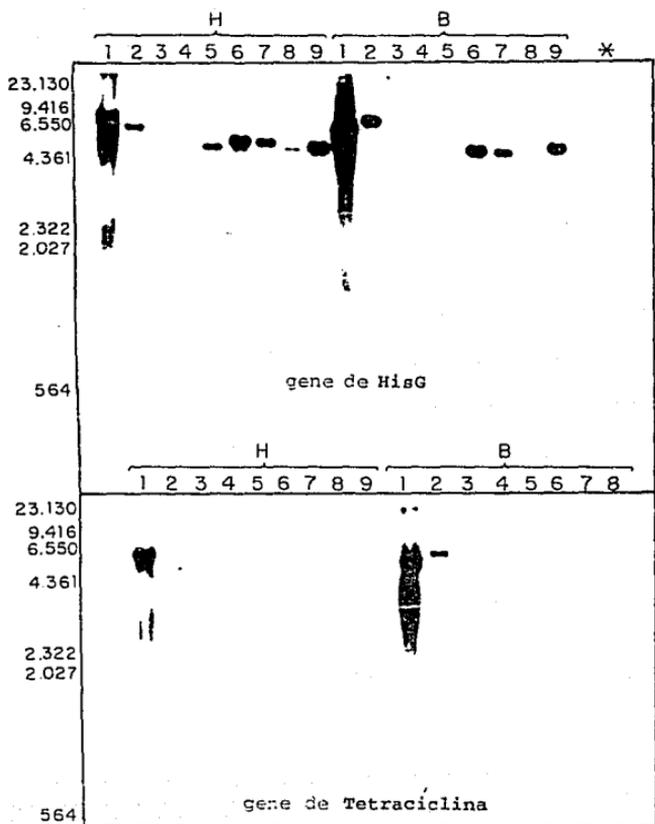


Fig.- 7 DNA de diferentes cepas digerido con las enzimas H: Hind III y B: Bgl II por separado. e hibridado con : *HisG* (I), y con el gene de tetraciclina (II). Cepas: SL1 (1), SL2 (2), SLAe⁻ (5), SLBe⁻ (6), SLCe⁻ (7), *E. coli* T⁺-HisG-Tc^r. (8), SL3261 (9). Marcador de peso molecular lamda/Hind III (*).

plásmido, y no en la banda cromosomal. Considerando que la señal de un gene cromosomal es más débil por estar en una sola copia, comparado con uno que está en un plásmido con 5 o 6 copias por célula, decidimos aumentar la cantidad del DNA digerido.

En la fig. 8.I se observan los resultados de otro ensayo de hibridación, ahora con el marcador de peso molecular (*) en el centro. En este nuevo gel no se observa una diferencia entre las bandas de los carriles H5, H6 y H7, o entre los carriles B5, B6 y B7, lo que indica que muy probablemente que la diferencia que se observa en el primer gel se deba a un artefacto de la técnica. Además, continúa sin observarse una señal clara al hibridar con Tc (figura 8.II). Por su parte la cepa del carril 1 continúa sin poderse analizar bien.

En este gel es más claro que la banda cromosomal de la cepa del carril H.2 migra igual que la banda de la cepa control SL3261 del carril H.9. De acuerdo a los tamaños de las bandas en este gel podemos descartar la posibilidad (a) de la figura 6, porque no se observa la banda de 4100 pb, sin embargo la posibilidad (b) no es claro afirmarla o descartarla porque el tamaño de la banda esperada, de 9.5 Kb, es muy parecida a la banda del plásmido linealizado que es de 11.1 Kb. Por otro lado, con la enzima *BglII* sólo se observa una banda (en el carril B.2); si el plásmido estuviera fuera del cromosoma esperaríamos dos bandas, una del plásmido (super-enrollado), que se esperaría más abajo de 11.1 Kb y, otra del cromosoma igual a la del carril B.9. Esta banda única que se ve, al parecer migra igual o incluso más arriba que la banda más grande del marcador de peso

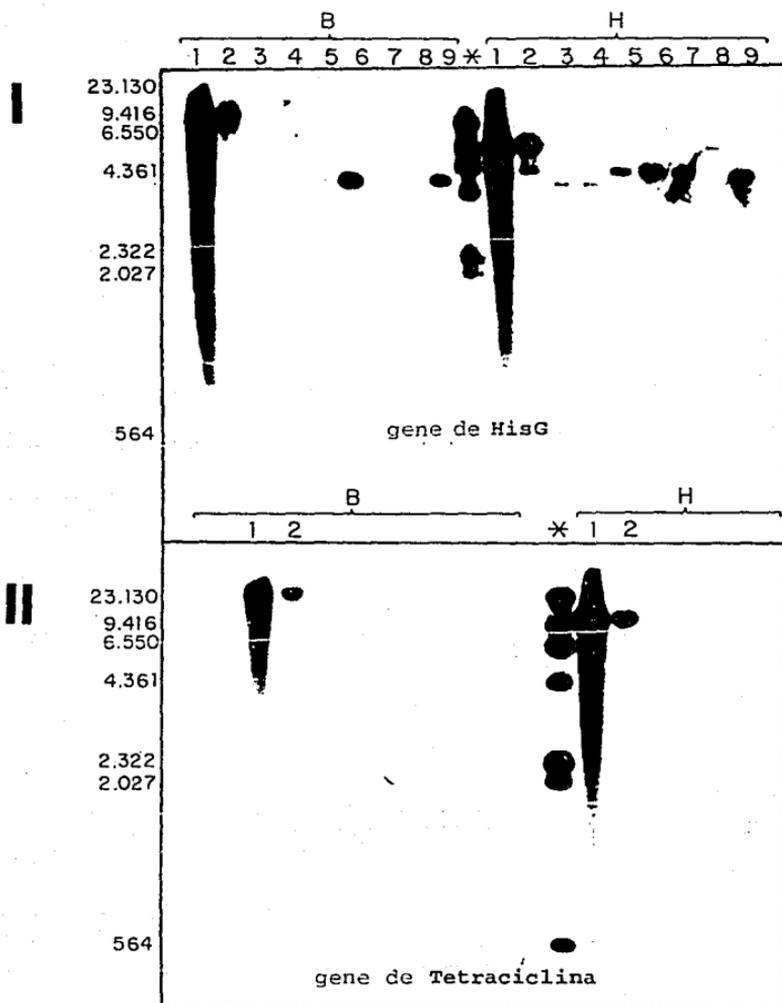


Fig.- 8 DNA de diferentes cepas digerido con las enzimas H: Hind III y B: Bgl II por separado, e hibridado con : *HisG* (I), y con el gene de tetraciclina (II). Cepas: SL1 (1), SL2 (2), SLAe^r (5), SLBe^r (6), SLCe^r (7), *E. coli* T^r-HisG-Tc^r. (8), SL3261 (9). Marcador de pesc molecular lamda/Hind III (*).

molecular, que es de ~23.1 Kb. Si pensamos en la posibilidad (b) de la fig. 6 y sabemos que el tamaño de la banda cromosomal normal de *his* (carril B.9, fig. 8.I) es de ~5000 pb, la integración del plásmido incrementaría el tamaño de esta banda hasta ~16 Kb. Ahora bien, para explicar el tamaño mayor de 23 Kb de esta banda del carril B.9, quizás podríamos pensar en dos moléculas de plásmido integrado en esta región del cromosoma (~5.0 Kb + 22.2 Kb = ~27.2 Kb).

Se diseñó un nuevo ensayo de hibridación, para analizar las cepas SL1 y SL2, intentando ahora con otras enzimas y utilizando también como sonda de hibridación al plásmido pHSG415, además de los genes de tetraciclina y de *his*.

Se usaron las enzimas *Bam*HI y *Pst*I. De acuerdo con la fig. 4, *Bam*HI corta al plásmido en dos puntos dando una banda de 2.6 Kb que lleva la mitad del gene de Tc unido a una región de *hisG*, y otra banda de 8.5 Kb que lleva el resto del plásmido vector, una región de *hisG* y la mitad restante del gene de Tc. Por su parte la enzima *Pst*I también origina dos bandas, una de 6.3 Kb que principalmente corresponde a la parte del plásmido vector, la otra banda de 4.8 Kb corresponde al inserto de Tc con las dos regiones de *hisG*. En la región conocida de *hisOGD* cromosomal no hay sitios de restricción para *Bam*HI y *Pst*I.

En la fig. 9 se muestra el DNA digerido de las cepas SL1, SL2 y SL3261 (carriles 1, 2 y 4 respectivamente), y el del plásmido T^r-*hisG*-Tc^r en el carril 3 como control, hibridados con el plásmido pHSG415. El plásmido pHSG415 sólo hibrida con la banda de 8.5 Kb del plásmido T^r-*hisG*-Tc^r digerido con *Bam* HI, y con la banda de 6.3 Kb que aparece al cortar con *Pst*I.

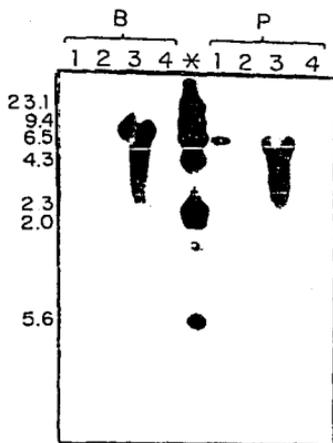


Fig.- 9 Southern de DNA total de las cepas SL1 (1), SLb (2) y SL3261 (4), en el carril (3) esta el plasmido T^c -*hisG*- Tc^r y (*) es DNA de lambda digerido con HindIII como marcador de peso molecular. **B**: DNA digerido con BamHI, **P**: DNA digerido con PstI. Se utilizo al plasmido **pHSG415** como sonda de hibridacion.

En el carril de la cepa SL1 aparecen señales que corresponden perfectamente con las bandas del plásmido control (carril 3) tanto con *BamHI* como con *PstI*. Esto nos indica que el plásmido completo está dentro de la bacteria y que muy probablemente se encuentra como elemento extracromosómico. En el carril de la cepa SL2 no se observó ninguna señal.

En la figura 10 se observa un gel similar al anterior pero hibridado con *hisG*. Las tres fotografías de esta figura corresponden al mismo gel pero con tres diferentes tiempos de exposición, 3h, 24h y 55h, de izquierda a derecha, respectivamente. La cepa SL1 se comporta igual que el plásmido T^r-*hisG*-Tc^r (3). Con *BamHI* la sonda de *hisG* reconoce las bandas de 8.5 Kb y de 2.6 Kb. Con *PstI* reconoce la banda de 4.8 Kb. En ninguno de los carriles 1, 2 y 4 se observó la señal esperada de la banda cromosomal de *hisG*, lo que hace más difícil la buena interpretación de los resultados.

Cuando se usa el gene de Tc como sonda de hibridación (fig. 11) se detectan las dos bandas esperadas en el carril 3 al cortar con *BamHI*, y la banda de 4.8 Kb cuando se corta con *PstI*. Las bandas de la cepa SL1 que se observan se comportan igual que las bandas del plásmido control, esto parece apoyar la idea de que esta cepa tiene el plásmido completo como elemento extracromosómico no integrado.

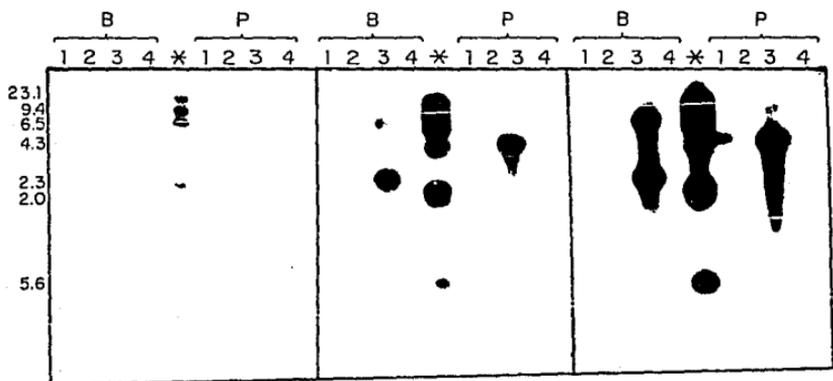


Fig.- 10 Southern de DNA total de las cepas SL1 (1), SLb (2) y SL3261 (4), en el carril (3) esta el plasmido T^c -hisG- Tc^c y (*) es DNA de lamda digerido con HindIII como marcador de peso molecular. B: DNA digerido con BamHI, P: DNA digerido con PstI. Se utilizo al gene de *HisG* como sonda de hibridacion. Los tiempos de exposicion son: 3 h, 24 h y 55 h.

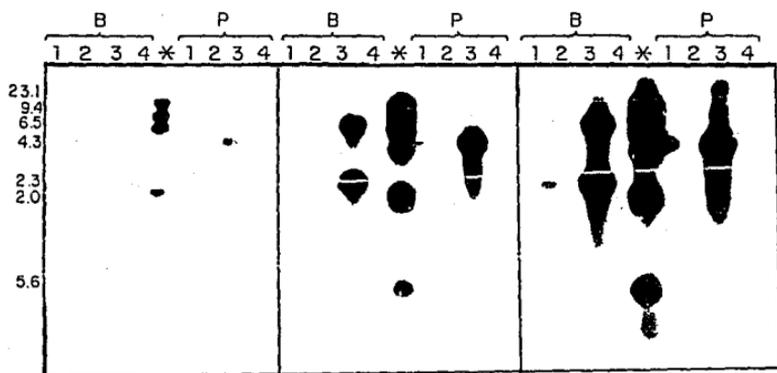


Fig.- 11 Southern de DNA total de las cepas SL1 (1), SL2 (2) y SL3261 (4), en el carril (3) esta el plasmido T^c -hisG-Tc^r y (*) es DNA de lamda digerido con HindIII como marcador de peso molecular. B: DNA digerido con BamHI, P: DNA digerido con PstI. Se utilizo al gene de Tetraciclina como sonda de hibridacion. Los tiempos de exposicion son: 3 h, 24 h y 55 h.

DISCUSION

David Hone *et al.* 1988, reportaron una frecuencia de recombinación sencilla de 1×10^{-3} entre un plásmido y la región cromosomal de *hisOG* de una cepa mutante *galE* de *S. typhimurium* (LT2H1). Dos eventos de recombinación implican entonces una frecuencia de 1×10^{-6} , es decir, una por cada millon de bacterias es posible que sea una doble recombinante. De acuerdo a este reporte, en nuestros experimentos de selección de la doble recombinante al tomar 10^8 bacterias estaríamos tomando aproximadamente 100 bacterias con eventos de recombinación.

Sin embargo, los resultados obtenidos indican que la frecuencia de dobles recombinantes para el sistema que trabajamos es menor de 1×10^{-8} , y por esta misma razón las estrategias utilizadas para seleccionar las dobles recombinantes no fueron las más adecuadas.

El resto del sistema se comportó bien hasta el momento de trabajar con el plásmido termosensible T^s -HisG- Tc^r en la cepa SL3261. Como se observa en la gráfica 5 el plásmido no se comporta igual que en *E. coli* o que en SL5283, ya que al parecer hay una disminución de su termosensibilidad, es decir es más termoestable. Esta pérdida parcial de la termosensibilidad podría explicar en parte la dificultad para seleccionar una doble recombinante, aún cuando su frecuencia fuera alta. Hay varias posibilidades para explicar este comportamiento, las más

factibles son dos: que haya ocurrido una mutación en el plásmido que revierta la función normal de replicación; que el plásmido se integre completamente al cromosoma a la frecuencia reportada de 1×10^{-3} , manifestándose así en un porcentaje alto de una población, o bien que exista una diferencia fenotípica entre las cepas MC1061, SL5283 y SL3261 que den por resultado las anomalías que estamos observando.

La primera opción es posible, ya que Armstrong, K. A. *et al.* (1984) determinaron que la proteína codificada por el gene *rep101* del plásmido pSC101 (llamada proteína RepA) es requerida para la replicación del plásmido, y que el plásmido derivado termosensible pHSG1 (del cual deriva el pHSG415) presenta una mutación puntual que provoca un cambio de C a T en el nucleótido 947 del gene *rep101*. Este cambio ocurre en la segunda posición del codon GCT dando GTT y produce un cambio de alanina a valina a nivel de la proteína.

La segunda opción contempla que esté ocurriendo la integración del plásmido al cromosoma, y a alta temperatura el plásmido sea replicado como parte del cromosoma, y por eso no se observe la pérdida del plásmido en la población. Existen trabajos que prueban que cuando se pone un plásmido en una bacteria bajo condiciones en las que el plásmido no se replica se favorece la integración del plásmido al cromosoma. Además, se sabe que cuando bacterias con un plásmido integrado al cromosoma se ponen en condiciones en las que se pueda replicar el plásmido esto trae consecuencias letales para la bacteria (Yamaguchi, K. & J. Tomizawa, 1980).

Esta observación es interesante y se puede aprovechar para modificar nuestra estrategia de selección de dobles recombinantes. De hecho hay algunos reportes en los que, basados en esta misma observación han realizado trabajos de obtención de cointegrados y de productos de disociación para obtener cambios específicos en el cromosoma bacteriano (Cunningham, P.R 1985; Hamilton, C.A 1989).

Recientemente Blomfield *et al.* (1991) reportaron un sistema en el que también utiliza un plásmido termosensible y secuencias homólogas al cromosoma para realizar un intercambio alélico entre el plásmido y el cromosoma. Primero seleccionan bacterias que hayan integrado el plásmido al cromosoma por un evento de recombinación, después las crecen a la temperatura permisible de replicación para seleccionar aquellas bacterias que hayan perdido al plásmido del cromosoma, como resultado de un segundo evento de recombinación. Luego seleccionan aquellas en las que haya ocurrido el intercambio alélico y las crece de nuevo a la temperatura restrictiva para curar el plásmido. Todos estos trabajos han sido realizados en *E. coli* sin embargo debieran ser posibles de aplicarse en *Salmonella* mientras no se demuestre lo contrario.

En cuanto a la tercera opción, en la que se contemplan las posibles diferencias fenotípicas entre las cepas de *E. coli* y las de *S. typhimurium* como las causas directas de la alteración del comportamiento de termosensibilidad del plásmido, resulta que el plásmido pHSG415 es un derivado de pSC101 que fue mutagenizado y seleccionado en cepas de *E. coli*, el cual sin embargo, fue aislado originalmente de una cepa de *Salmonella panama* (Cohen y Chang, 1977).

Aunque no existen reportes claros al respecto existe la posibilidad de que *Salmonella* posea proteínas semejantes a la proteína RepA esencial de los plásmidos del tipo de pSC101 que de alguna manera estén sufriendo la función de las proteínas RepA mutantes termosensibles, permitiendo la replicación normal del plásmido incluso a altas temperaturas.

Hasta este momento no tenemos los elementos suficientes para inclinarnos más por alguna de las posibilidades expuestas anteriormente. Creemos que cualquier estrategia que se elija para continuar con este proyecto debe considerar seriamente las posibilidades anteriores de manera que podamos entender lo que está pasando, y sobre todo para poder alcanzar el objetivo planteado inicialmente.

Es recomendable mejorar el método de selección de las dobles recombinantes, de tal forma que sea más directo. Esto es posible si anexamos al plásmido vector un marcador selectivo que nos permita seleccionarlo negativamente, de esta manera podemos eliminar las bacterias que contengan plásmidos aún después de haber sido curadas.

Si esta selección la hacemos en presencia de tetraciclina estaremos seleccionando directamente las bacterias que tengan el gene integrado de tetraciclina y hayan perdido el plásmido vector. Un ejemplo de estas técnicas es la utilización del gene *sacB* de *Bacillus subtilis* (Lepesant, *et al.* 1972). La expresión de este gene clonado en *E. coli* y en otras bacterias Gram-negativas es letal en presencia de sacarosa a 37°C (Gay *et al.* 1985).

BIBLIOGRAFIA

- Arias *et al.* 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and Immunological Characterization of a Polypeptide Containing the Cleavage Sites Associated with Trypsin Enhancement of Rotavirus SA11 Infectivity. J. Gen. Virol. 68: 633-642.
- Arias *et al.* 1989. Priming for Rotavirus Neutralizing Antibodies by a VP4 Protein Derived Synthetic Peptide. J. Virology. 63:, No.12.
- Bastardo JW, *et al.* 1981. Preparation and characterization of antisera to electrophoretically purified SA11 virus polypeptides. Infect. Immun. 34:641-647.
- Bishop, R.F. *et al.* 1973. Virus Particles in Epthelial Cells of Duodenal Mucosa from Children with Viral Gastroenteritis. Lancet II: 1281-1283.
- Blomfield, I.C, V. Vaughn, R.F. Rest & B.I Eisenstein. 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sac B* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. Molecular Microbiology. 5 (6), 1447-1457.
- Bochner, B.K. 1980. Positive Selection for Loss of Tetracycline Resistance. Journal of Bacteriology 143: 926-933.
- Brown *et al.* 1987. An attenuated *aroA* *Salmonella typhimurium* Vaccine Elicits Humoral and cellular Immunity to Cloned B-Galactosidasa in Mice. J. of Infect Dis. 155: 85-92.
- Charles, I. and G. Dougan. 1990. Gene Expression and the Development of Live Enteric Vaccines. TIBTECH 8: 117-121.
- Clements, J.D. and S. El-Morshidy. 1984. Construction of a potential Live Oral Bivalent Vaccine for Typhoid Fever and Cholera-*Escherichia coli*-Related Diarrheas. Infection and Immunity Nov. p. 564-569.

- Cohen, S.N. y A.C.Y. Chang. 1977. Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. J. Bacteriol. 132:734-737.
- Christy C, Madore HP, Treanor JJ, *et al.* 1986. Safety and immunogenicity of live attenuated monkey rotavirus vaccine. J Infect Dis. 154:1045.
- Cunningham, R.P. & B. Weiss. 1985. Endonuclease III (*nth*) mutants of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: pp. 474-478.
- Curtiss III, R. *et al.* 1988. Avirulent *Salmonella typhimurium* *Acya Acrp* Oral vaccine Strains Expressing a Streptococcal Colonization and Virulence Antigen. Vaccine 6: 155-160.
- Curtiss III, R. 1990. Antigen Delivery Systems For Analysing Host Immune Responses and for Vaccine Development. TIBTECH 8: 237-240.
- Christensen, M.L. 1989. Human Viral Gastroenteritis. Clinical Microbiology Reviews 2: No. 2 51-89.
- Davis, R.W., D. Botstein, and J.R. Roth. 1980. Advanced Bacterial Genetics (A Manual for Genetic Engineering). CSHL. New York.
- Dougan *et al.* (1986). Infect. Immun. 52, 344-347.
- Dougan, G. *et al* 1987. Live Oral *Salmonella* vaccines: Potential use of Attenuated Strains as Carriers of Heterologous Antigens to the Immune System. Parasite Immunol. 9: 151-160.
- Dougan, G. *et al.* 1987. Live Attenuated *Salmonella* vaccines as Carriers of heterologous Antigens to the Immune Systems. Vaccines 87 CSHL: 279-282.
- Dougan, G. *et al.* 1990. Semin Virol 1, 29-37.
- Estes, M.K. and J. Cohen. 1989. Rotavirus Gene Structure and Function. Microbiological Reviews 53: 4 pp. 410-449.

- Fellay, R. *et al* (1987). Interposon Mutagenesis of Soil and Water Bacteria: a Family of DNA Fragments Designed for in vitro Insertional Mutagenesis of Gram-Negative Bacteria. Gene 52: 147-154.
- Flewett, T.H. *et al.* 1974. Relationship between virus from acute gastroenteritis of Children and Newborn Calves. Lancet 2: 61-63.
- Flores, J. and A.Z. Kapikian. Vaccines Against Rotavirus. Chap 43. pp. 765-787. in New Generation Vaccines edited by Woodrow C.G. and M.M Levine. 1990. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, Berkelman T, and CI Kado, 1985. Positive selection procedure for the entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 164:918-921.
- Germanier, R. and E. Furer. 1975. Isolation and Characterization of *galE* Mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: A Candidate Strain For a Live, Oral Typhoid Vaccine. The Journal of Infectious Diseases 131: 553-558.
- Greenberg HB, Valdesuso J, van Wyke K, *et al.* 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. J Virol. 47:267-275.
- Hamilton, M.C, M. Aldea, B.K. Washburn, P.Babitzke, & S.R. Kushner. (1989). New Method for Generating Deletions and Gene Replacements In *Escherichia coli*. Jour. of Bacteriology. Sept. pp. 4617-4622.
- Hashimoto-Gotoh, T. *et al.* 1981. Specific-Purpose Plasmid Cloninc Vectors I. Low Copy Number, Temperature-Sensitive, mobilization-defective pSC101-Derived Containment Vectors.Gene 16: 227-235.
- Hoiseth, S.K., & A.D. Stocker 1981. Aromatic-Dependent *Salmonella typhimurium* are non Virulent and Effective as Live Vaccines. Nature. 291: 238-239.
- Hone, D. *et al.* 1987. Contruction of Defined *galE* Mutants of *Salmonella* for Use as Vaccines. The Journal of Infectious Diseases 156: 167-174.

- Hone, D. *et al.* 1988. A Chromosomal Integration System for Stabilization of Heterologous Genes in *Salmonella typhimurium* Based Vaccine Strains. Microbial Pathogenesis 5: 407-418.
- Hone, D. and J. Hackett. 1989. Vaccination Against Enteric Bacterial Diseases. Reviews of Infectious Diseases 11: 853-877.
- Kapikian Z.A. *et al.* Rhesus rotavirus: a candidate vaccine for prevention of human rotavirus diseases. In: Lerner RA, Chanock RM, Brown F, eds. Vaccines 85 molecular and chemical basis of resistance to parasitic, bacterial and viral diseases. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1985:357.
- Kapikian, Z.A. *et al.* 1986. Rotavirus: The Major Etiologic Agent of Severe Infantile Diarrhea May Be Controllable by a "Jennerian" Approach to Vaccination. Journal of Infectious Diseases 153: No. 5. 815-822.
- Kapikian, Z.A. and R.M. Chanock. 1990. Rotaviruses. En: B.N. Fields, D.N. Knipe, J.L. Melnick, R.M. Chanock, B. Roizman, and R.E. Shope. Virology. Raven Press, N.Y.
- Killen HM, Dimmock NJ, 1982. Identification of an neutralization specific antigen of a calf rotavirus. J. Gen. Virol. 62:297-311.
- Lepesant JA, Kunst F, Lepesant-Kejzlarova J and R Dedonder, 1972. Chromosomal location of mutations affecting sucrose metabolism in *Bacillus subtilis* Marburg. Mol. Gen. Genet. 118:135-160.
- Lizano, M. López, S. y C. Arias. 1991. The amino terminal half of rotavirus SA11 4fM VP4 protein contains a hemagglutination domain and primes for neutralizing antibodies to the virus. Journal of Virology 65: No. 3 p 1383-1391.
- López, S. *et al.* 1985. Primary Structure of the cleavage Site Associated with Tripsin Enhancement of rotavirus SA11 Infectivity. Virology 144: 11-19.
- Maniatis T, Fritsch EF y J Sambrook. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd Ed. CSHL Press.

- Maskell, D., Sweeney, K.J., O'callaghan, D., Hormaeche, C.E., Liew, F.Y. and Dougan, G. (1987) Microb. Pathog. 2, 211-221.
- Miller, J. 1972. Experiments in Molecular Genetics. CSHL. N.Y.
- Molina, C.N. and C.D. Parker. 1990. Murine Antibody Response to Oral Infection with Live *aroA* Recombinant *Salmonella dublin* Vaccine Strains Expressing Filamentous Hemagglutinin Antigen from *Bordetella pertussis*. Infection & Immunity Aug. 2523-2528.
- O'Callaghan, D. *et. al.* (1988) FEMS Microbiol Lett. 52, 269-274.
- Prasad, B.V. *et al.* 1988. Three-Dimensional Structure of Rotavirus. J. Mol. Biol. 199: 269-275.
- Poirier, T.P. *et. al.* (1988) J. Exp. Med. 168, 25-32.
- Roseto, A.J. *et al.* 1979. Structure of Rotavirus as Studied by the Freeze-Drying Technique. Virology 98: 471-475.
- Sadoff, J.C. *et. al.* (1988) Science 240, 236-240.
- Sabara M, Gilchrist JE, Hudson GR, Babiuk LA. 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. J. Virol. 53:58-66.
- Sabara M, Barrington A, L A Babiuk. 1985b. Immunogenicity of a bovine rotavirus glycoprotein fragment. J. Virol. 56:1037-1040.
- Salas-Vidal, E. M. Plebański, S. Castro, G. Perales, E. Mata, S. López and C.F. Arias. 1990. Synthesis of the Surface Glycoprotein of Rotavirus SA11 in the *aroA* Strain of *Salmonella typhimurium* SL3261. Res. Microbiol. 141: 883-886.
- Snyder, J.D. and M.H. Merson. The Magnitude of the Global Problem of Acute Diarrhoeal disease: A Review of Active surveillance data. Bull. WHO 1982; 60: 605-613.

- Stevenson, G. and Manning, P.A. (1985) FEMS Microbiol. Lett. 28, 317-321.
- Strugnell, R.A. 1990. Stable Expression of Foreign Antigens From the Chromosome of *Salmonella typhimurium* Vaccine strains. Gene 88: 57-63.
- Tarkka, E. *et al.* 1989. Microb. Pathog. 6, 327-335.
- Taylor *et al.* (1986). Parasitology 91, S73-S81.
- Traumont, E.C., Chung, R., Berman, S., Keren, D., Kapfer, C., and Formal, S.B. (1984). J. Infect. Dis. 149, 133-139
- Vesikari T, Isolauri E, Delem A, DHondt E, Andre FE, Zissis G. 1983. Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus and vaccine strains RIT4237 in adults and young children. Lancet 2:807.
- W.H.O. Steering Committee of the Scientific Working Group on Viral Diarrhoeas. Nomenclature of Human Rotaviruses: designation of subgroups and serotypes. Bull. WHO. 1984, 62:501-503.
- Wolf, J.L. *et al.* 1984. The membranous Epithelial (M) Cell and the Mucosal Immune System. Ann. Rev. Med. 35: 95-112.
- Yamaguchi, K. & J. Tomizawa. 1980. Establishment of *Escherichia coli* Cells with an Integrated High Copy Number Plasmid. Molec. gen. Genet. 178. pp 525-533.