



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

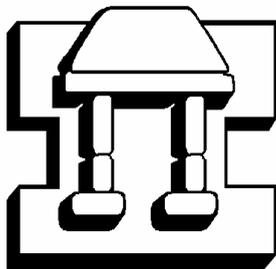
**“CONSTRUCCION DE UN BANCO
GENOMICO DEL BACTERIÓFAGO
FIZ15”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A :

FAVIOLA ISABEL TAVARES CARREÓN



IZTACALA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. SERGIO VACA PACHECO**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

AGOSTO DE 2004



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.

A mis padres Isabel y Porfirio y mis hermanas Paulina y Janet por que con su apoyo y gracias a su tolerancia y amor pude cumplir uno de mis tantos sueños.

Mil Gracias

Agradecimientos

Al Dr. Sergio Vaca porque nunca olvidare la charla que mantuvo una vez conmigo, me dio mucha confianza y fe en mi misma.

Al Dr. Erasmo Negrete por ser un maestro del cual aprendí, un compañero pero sobre todo mi amigo.

Al Dr. Diego Arenas y M en C Irma Dueñas por todos sus comentarios sobre la tesis y hacerme ver que un trabajo siempre se puede mejorar.

A Octavio García por enseñarme todo lo que sabía y que ahora lo he puesto más en práctica que nunca.

A los M en C Gloria Luz Paniagua y Erick Monroy por abrirme un espacio en su laboratorio y aprender un poco más; también a Susan, Imelda, Olivia, Paty y la inigualable Doñita por lo aprendido de ustedes.

A todos mis familiares desde mis abuelos Juanita, Ramiro y Esperanza a mis tíos Verónica, Sandra, Delia, Nacho, Carmen, María, Elizabeth y Ramiro por estar siempre al pendiente de mi y de lo que hacia.

A Angel por ser una persona crucial en mi vida, un gran amigo y un gran apoyo durante estos años.

A todos mis amigos del CCH y de Iztacala que han estado conmigo: Angélica, Anita, Luis, Verónica, Soraya, Pablo, Oscar, Cristian, Juan, Antonio, Fabián, Abel Fernando, Olivier, Elizabeth, Angélica, Marcela, Gabriela, Paulo, Augusto, Ana Lilia, Ricardo y Lolita por su amistad, nuestras platicas que nos hicieron conocernos un poco más y todos los momentos locuaces.

INDICE

Resumen

I. <u>Introducción</u>	1
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1 Estructuras antigénicas y toxinas.....	2
1.2 Patogenia.....	3
2. Bacteriófagos.....	5
2.1 Composición química.....	6
2.2 Morfología	7
2.3 Ciclos de Vida.....	8
2.4 Conversión lisogénica y transferencia genética horizontal	11
3. Bacteriófagos que causan conversión lisogénica en <i>P. aeruginosa</i>	15
4. Bacteriófago D3.....	16
5. Bacteriófago FIZ15.....	17
6. Bancos genómicos.....	19
6.1. Vector pUC19.....	20
II. <u>Objetivos</u>	22
1. General.....	22
2. Particulares.....	22
III. <u>Material y Métodos</u>	23
1. Material biológico.....	23
2. Medios de cultivo.....	23
3. Micrografía electrónica del Bacteriófago FIZ15.....	23

4. Obtención, Cuantificación y Restricción del ADN de FIZ15.....	24
5. Obtención, Purificación y Restricción del ADN plasmídico.....	26
6. Ligación de los Fragmentos de ADN fágico al plásmido pUC19.....	27
7. Obtención de Transformantes.....	27
7.1 Preparación de Células Competentes.....	27
7.2 Transformación de la ligación.....	28
IV. <u>Resultados</u>	29
1. Micrografía electrónica del Bacteriófago FIZ15.....	29
2. Obtención de ADN fágico.....	30
2.1 Cuantificación de ADN fágico	31
2.2 Obtención de los fragmentos del ADN fágico	31
3. Obtención del ADN plasmídico	35
3.1 Obtención del Vector Restringido	36
3.2 Cuantificación del Vector	39
4. Ligación.....	39
5. Selección de colonias transformadas con plásmidos recombinantes	41
6. Búsqueda de los fragmentos por análisis de restricción....	43
V. <u>Discusión</u>	47
VI. <u>Conclusiones</u>	52
VII. <u>Perspectivas</u>	53
VIII. <u>Apéndice</u>	55
IX. <u>Bibliografía</u>	61

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram-negativa considerada como patógeno oportunista causante del 10-20% de las infecciones de pacientes hospitalizados. Posee gran versatilidad metabólica y es resistente a un gran número de antibióticos y metales pesados. Se ha reportado que la mayoría de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* son lisógenas y que los bacteriófagos juegan un papel importante en la transferencia genética horizontal y por ende en la virulencia bacteriana. El fago FIZ15 fue aislado en nuestro laboratorio a partir de una cepa clínica de *P. aeruginosa*. Se ha reportado que FIZ15 causa conversión lisogénica, expresada como incrementos de la adhesión de la lisógena a células bucoepiteliales humanas (CBH), de la resistencia al efecto bactericida del suero humano y de la resistencia a la fagocitosis por macrófagos peritoneales de ratón. El propósito de este trabajo fue construir un banco genómico de FIZ15 para ello el ADN de FIZ15 se digirió con las enzimas de restricción *Hind* III y *Sau* 3A1, los fragmentos se ligaron en el gen *lacZ* del plásmido pUC19 (linealizado con *Hind* III y *Bam* HI). Los plásmidos recombinantes se introdujeron por transformación a la cepa DH5 α de *E. coli* y seleccionándose las transformantes *Lac* por resistencia a ampicilina, α -complementación y análisis de restricción. De este modo se obtuvo el banco genómico de FIZ15 que mide 54 800 pb representado en 10 clonas.

I. INTRODUCCIÓN

1. *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa es un bacilo gramnegativo dotado de motilidad que mide aproximadamente $0.6 \times 2 \mu\text{m}$. Es aerobio facultativo y crece en muchos tipos de medios de cultivo, a temperaturas entre 4°C y 42°C , en los que forma colonias redondas y lisas de color verde fluorescente. Con frecuencia produce un pigmento azulado no fluorescente, la piocianina, que difunde en el agar. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes y que otros organismos no pueden asimilar (Hardalo y Edberg, 1997), por ello se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, aguas destiladas y contaminadas, así como de plantas y animales.

P. aeruginosa PAO1 está libre de profagos y se utiliza ampliamente como modelo para estudiar aspectos bioquímicos y genéticos. Recientemente se publicó la secuencia completa del genoma de la cepa PAO1 (cepa tipo de *P. aeruginosa*). El tamaño de su genoma es de 6.3 millones de pares de bases, siendo el genoma bacteriano secuenciado más grande en comparación con otros genomas de bacterias secuenciados. Su secuencia provee información acerca de su gran versatilidad metabólica así como una alta proporción de

genes reguladores involucrados en el catabolismo, cuatro sistemas de quimiotaxis y de transporte de componentes orgánicos. Más de la mitad de los genes de *P. aeruginosa* PAO1 muestra una homología cercana y un arreglo transcripcional en operones muy similar al de *Escherichia coli*. Del análisis del genoma de esta bacteria es notoria la gran abundancia de genes que parecen codificar para bombas que sacan compuestos de la célula (Sttover *et al.*, 2000). La abundancia de estos transportadores pudiera estar relacionada con su alta resistencia a distintos compuestos tóxicos (Nikaido *et al.*, 1996) y en última instancia con su gran versatilidad; además de mencionar que el arreglo de los genes que intervienen en la virulencia de la bacteria no están codificados en las conocidas islas de patogenicidad sino más bien están disgregados en su cromosoma (Sttover *et al.*, 2000).

1.2 ESTRUCTURAS ANTIGÉNICAS Y TOXINAS.

P. aeruginosa representa un problema en el sector salud, sobre todo en centros hospitalarios cuando se trata de pacientes inmunocomprometidos, debido a la dificultad de erradicar a esta bacteria ya que presenta una alta resistencia a antibióticos.

Esta bacteria produce una serie de compuestos tóxicos que participan en la patogénesis e infección además de contar con pilis que se extienden desde la superficie de la célula y promueven la adhesión sobre las células

epiteliales del huésped. La cápsula de polisacáridos es la responsable de las colonias mucoides presentes en cultivos de pacientes con fibrosis quística (Govan y Deretic, 1996). La mayor parte de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de infecciones clínicas produce enzimas extracelulares que causan daño tisular e interfieren con el sistema inmune (Doring *et al.*, 1987). Entre las enzimas excretadas por *P. aeruginosa* se encuentran: elastasas, proteasas y dos hemolisinas: una fosfolipasa C termolábil y un glucolípido termoestable, así como el lipopolisacárido (LPS) (Tabla 1), el cual está presente en múltiples inmunotipos, y actúa como endotoxina (Murray y Kobayashi, 1997).

Las toxinas que destacan en *P. aeruginosa* son las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas las cuales producen necrosis tisular degradando las membranas y tejidos de diversos órganos. La exotoxina A impide la síntesis de las proteínas del hospedero mediante un mecanismo de acción idéntico al de la toxina diftérica, aunque su estructura no es idéntica (Pavloskis *et al.*, 1978).

1.3 PATOGENIA.

P. aeruginosa sólo es patógena oportunista cuando se introduce en regiones desprovistas de defensas normales, por ejemplo, mucosas y piel dañada por lesiones tisulares (Brooks *et al.*, 2002); por el empleo de catéteres intravenosos o urinarios o cuando hay neutropenia, como en los pacientes cancerosos sometidos a quimioterapia (Bergen y Shelhamer, 1996). Las

bacterias se unen a las mucosas o la piel y las colonizan, invaden localmente y producen enfermedades sistémicas. Estos procesos se favorecen por pili, enzimas y toxinas, descritas antes. El LPS desempeña una función directa en el origen de la fiebre, choque, oliguria, leucocitosis, y leucopenia, coagulación intravascular diseminada y síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto.

Tabla 1. Factores de Virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

FACTORES DE VIRULENCIA	EFEECTO BIOLÓGICO
Pili	Adherencia el epitelio respiratorio (Woods <i>et al.</i> , 1980).
Cápsula	Adherencia al epitelio traqueal (Pollack, 1984).
Endotoxina	Síndrome de sepsis: fiebre, shock, oliguria, leucopenia o leucocitosis, coagulación intravascular diseminada, anomalías metabólicas (Cryz <i>et al.</i> , 1984; Wieland <i>et al.</i> , 2002).
Exotoxina A	Inhibición de la síntesis de proteínas (Wick <i>et al.</i> , 1990; Young, 1980; Wieland <i>et al.</i> , 2002).
Exoenzina S	Inhibición de la síntesis de proteínas (Iglewsky <i>et al.</i> , 1978; Young, 1980).
Elastasa	Lesión tisular vascular, inhibición de la función neutrófila (Schultz y Miller, 1974).
Proteasa Alcalina	Lesión tisular; anticomplemento; inactivación de IgG (Kawaharajo <i>et al.</i> , 1975).
Fosfolipasa C	Lesión tisular (Berka y Vasil, 1982; Wieland <i>et al.</i> , 2002).

Esta bacteria está caracterizada por presentar resistencia a muchos agentes antimicrobianos, lo que dificulta el tratamiento de los pacientes infectados. También es frecuente que las cepas de *P. aeruginosa* sean resistentes a metales pesados entre los que destacan el cromato, cadmio, arsenato y telurio (Summers y Jacoby, 1978). Se ha reportado que la mayor parte de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* son lisógenas y algunas polilisógenas (Holloway, 1975); lo cual puede estar relacionado con la adquisición de nueva información genética y por tanto con su virulencia.

2. BACTERIÓFAGOS.

Las bacterias son huéspedes de un grupo especial de virus que reciben el nombre de bacteriófagos o fagos. Aunque un fago determinado es sumamente específico para su huésped, es muy probable que cualquiera de los tipos conocidos de bacterias pueda servir como huésped de uno o más bacteriófagos.

Los bacteriófagos son uno de los elementos genéticos que juegan un papel importante en la adquisición de nueva información genética por varias especies bacterianas y que llevan a la evolución de éstas (Cheetham y Katz, 1995). Los bacteriófagos se definen como virus que infectan células bacterianas, siendo parásitos intracelulares a nivel genético, ya que requieren

de la maquinaria biosintética bacteriana para su replicación, transcripción y traducción para poder multiplicarse.

2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA.

Los fagos están compuestos por un solo tipo de ácido nucleico y nunca por ambos. Según el tipo de ácido nucleico que contengan se les denomina fagos ADN o ARN. Las proteínas estructurales constituyen el otro componente siempre constante en éstos. Algunos fagos también contienen lípidos como el caso del fago PM2, pero esto es excepcional.

Se ha encontrado gran variabilidad en el ácido nucleico de los fagos, muchos contienen ADN de doble cadena (biténico) o de cadena simple (monoténico) y otros presentan ARN de una cadena. A veces se llegan a encontrar bases raras en el ácido nucleico, como el caso de la hidroximetilcitosina de los fagos de la serie T (T2, T4 y T6) en lugar de la citosina, y ciertos fagos de *Bacillus subtilis* que contienen 5-hidroximetiluracilo en vez de timina. (Espejo, 1980)

El ácido nucleico del fago contiene la información necesaria para su reproducción en la bacteria hospedante, el cual se encuentra alojado en la cápside (poliédrica o filamentosa), protegido por proteínas contra la acción de

nucleasas. El ADN de los bacteriófagos tiene forma lineal, pero no es raro observar la aparición de formas circulares durante su duplicación.

Los genomas de los fagos varían ampliamente en tamaño. El genoma fágico más pequeño que se conoce, es del fago MS2, que es una sola molécula de ARN con 3, 566 nucleótidos y con sólo tres genes funcionales (Min-Jou *et al.*, 1972). En comparación, los fagos más grandes poseen suficiente ADN para codificar aproximadamente 200 proteínas de tamaño promedio; hay genes para la cubierta proteica, morfogénesis, enzimas y reguladores de la replicación del fago, inhibidores de las enzimas de restricción del huésped, enzimas de reparación del ADN, enzimas que intervienen en la recombinación, y proteínas que intervienen en la integración y escisión del ADN del profago.

2.2 MORFOLOGIA.

La forma y tamaño de los bacteriófagos varía bastante de unas especies a otras, pero al ser observados al microscopio electrónico, todos presentan una estructura básica que puede ser poliédrica o filamentosa. La forma predominante de los fagos poliédricos es el icosaedro (cápside). Los fagos con esta estructura contienen en ella el ácido nucleico y la mayor parte de las proteínas, generalmente van dotados de una cola con variaciones en cuanto a tamaño y forma de acuerdo a la especie; esta cola puede contener a su vez varios apéndices, como fibras o estructuras terminales. Es frecuente que los

fagos carentes de cola tengan pequeñas espículas ubicadas en los vértices del icosaedro. Los fagos filamentosos son bastantes simples, ya que no poseen apéndices, con una estructura más cilíndrica, con el ácido nucleico ubicado en una cavidad helicoidal interna.

El icosaedro y el filamento están formados por subunidades estructurales proteicas, cuyo número varía dependiendo de la complejidad del fago. Esta estructura de subunidades es general en los virus y ha sido confirmada por estudios de difracción de rayos X, microscopía electrónica y análisis químicos.

2.3 CICLOS DE VIDA.

Los bacteriófagos presentan ciclos de vida definidos y de acuerdo a ellos se les clasifica como líticos o temperados (lisogénicos).

A) VÍA LÍTICA

Para la mayoría de los fagos, esta vía comienza por la colisión al azar entre estos y la bacteria, que resulta en la adsorción del fago a un receptor específico de la superficie bacteriana por una reacción de afinidad estereoquímica. Posteriormente el fago inyecta su ADN mediante un proceso muy complejo, que incluye la contracción de la vaina que rodea la cola viral. El ADN es introducido de manera lineal al interior de la bacteria, donde dirige la

síntesis de proteínas estructurales fágicas así como la replicación de su ADN, que es encapsidado para formar nuevos bacteriófagos. Una vez que eclosiona la bacteria por acción de enzimas hidrolíticas, codificadas por el mismo genoma viral, los fagos liberados pueden reiniciar el ciclo infectando a otras bacterias.

El ciclo lítico consta de cuatro fases: (1) adsorción del fago a la célula huésped; (2) inyección del material genético del virus; (3) morfogénesis y (4) lisis (Fig. 1a).

B) VÍA LISOGÉNICA

Otros fagos llamados temperados pueden seguir cualquiera de dos vías mutuamente excluyentes: la lítica, ya descrita, y la vía lisogénica, la cual ocurre de manera similar al ciclo lítico en cuanto a adsorción e inyección del ADN fágico. Sin embargo, la expresión de los genes estructurales y de lisis se reprime por la acción de una proteína represora codificada por el genoma viral, y el ADN viral inyectado se integra al cromosoma bacteriano, replicándose como parte de éste y heredándose a las células hijas (Fig. 1b). Se llaman lisógenas o lisogénicas a las bacterias que presentan la capacidad de producir partículas de fagos en ciertas condiciones, mientras que los fagos

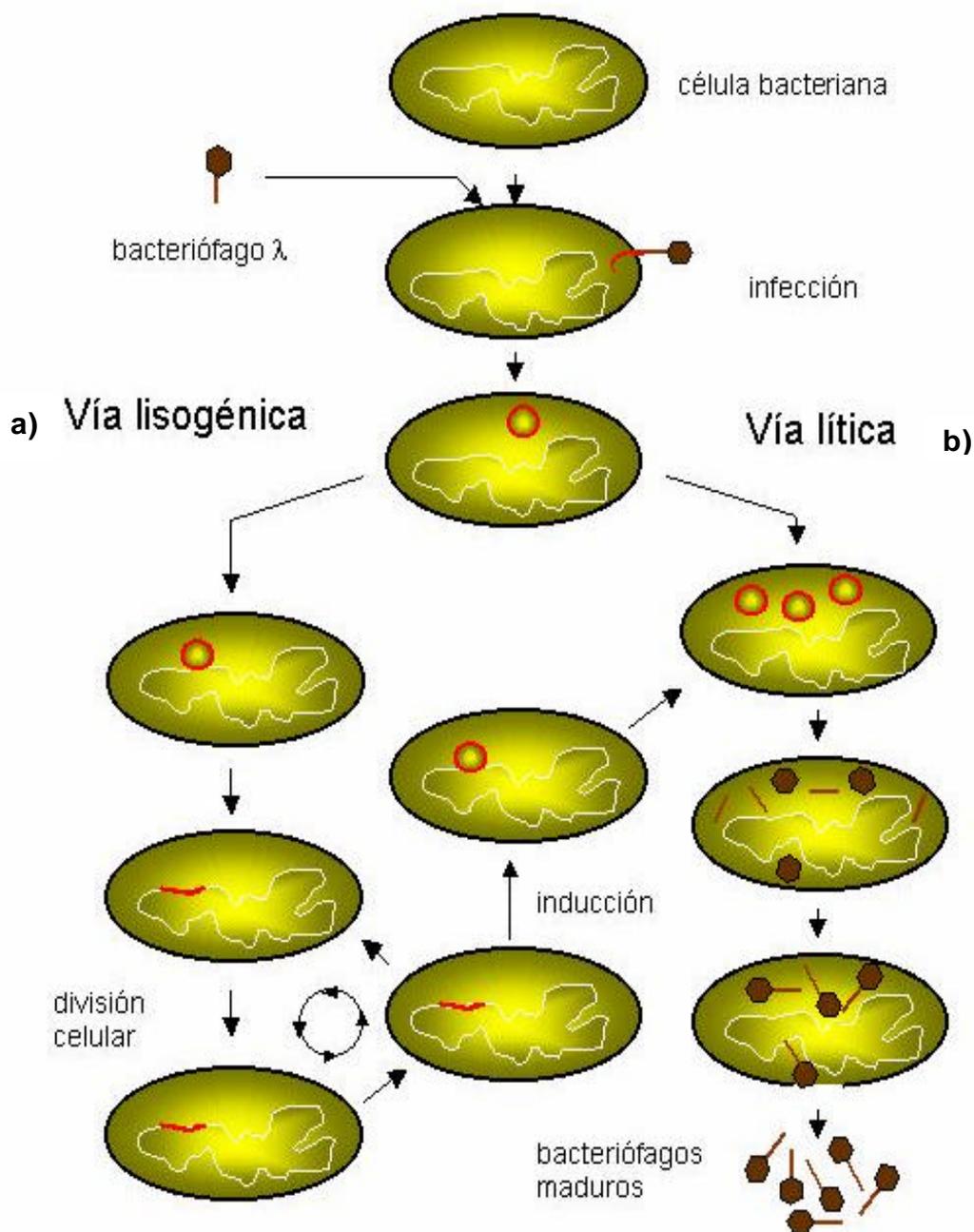


Fig 1. Ciclo de vida del fago λ . Después de la infección del bacteriófago, éste se desarrolla siguiendo la vía lítica (a) o la lisogénica (b).

capaces de establecer este tipo de relación reciben el nombre de fagos temperados. La forma latente del genoma viral que permanece en el interior del huésped sin destruirlo se conoce como profago. El profago suele estar integrado al genoma bacteriano, aunque algunos profagos permanecen como plásmidos.

Las lisógenas son inmunes a la superinfección por fagos de la misma inmunidad que el profago. Esta inmunidad se debe a que el represor se sintetiza en niveles superiores a los necesarios para reprimir los genes del profago, de modo que cuando otro fago de la misma inmunidad inyecta su ADN a la lisógena, éste es reconocido por el represor (unión al o los operadores) y no puede seguir la vía lítica ni la lisogénica, perdiéndose por dilución a medida que el cultivo crece.

2.4 CONVERSIÓN LISOGÉNICA y TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL.

Un fago temperado puede inducir un cambio en el fenotipo de su célula huésped, este tipo de cambio recibe el nombre de conversión lisogénica que con frecuencia implica alteraciones en las características de superficie celular, en la producción de toxinas o en las propiedades antigénicas de la bacteria (Kropinski, 2000). Por ejemplo, los fagos pueden alterar las propiedades de la bacteria hospedera, en cualquiera de todos los estadios del proceso infeccioso

incluyendo la adhesión bacteriana, colonización, invasión y extensión a través de los tejidos humanos; resistencia al sistema inmune; producción de exotoxinas; alteración en la sensibilidad a antibióticos, y transmisibilidad entre humanos (Wagner y Waldor, 2002).

Los bacteriófagos son uno de los elementos genéticos que juegan un importante papel en la adquisición de nueva información genética por varias especies bacterianas, y se ha estimado que cerca del 20% del genoma bacteriano puede estar compuesto por genes de bacteriófagos (Casjens *et al.*, 2000). Frecuentemente el genoma de los fagos contiene una gran variedad de genes de los cuales no todos intervienen en su ciclo de vida, y en ocasiones estos genes son transferidos horizontalmente a las bacterias por la infección de los fagos. Cuando estos genes llegan a codificar para factores de virulencia, la lisogenización por el fago incrementa la virulencia de la bacteria y algunas veces convierte a las no patógenas en altas y peligrosamente patógenas (Nakayama *et al.*, 1999).

Entre los mecanismos para la transferencia de ADN la conversión lisogénica por los bacteriófagos parece ser ventajosa en muchos casos. La conversión lisogénica es eficiente y en contraste con la transferencia de plásmidos por medio de la conjugación, no requiere un contacto íntimo entre las bacterias.

Los bacteriófagos pueden sobrevivir a condiciones críticas y en muchas de las ocasiones eliminar a la población bacteriana; pero cuando el ADN “extraño” es benéfico e importante para la población, puede ser conservado y reintegrado (Miao y Miller, 1999).

Por citar un ejemplo de conversión lisogénica y transferencia genética horizontal, el fago temperado ϕ CTX aislado de *P. aeruginosa* codifica para una toxina formadora de poro, llamada citotoxina (Hayashi *et al.*, 1990). El gen de la citotoxina (*ctx*) está presente en el genoma del fago ϕ CTX y las cepas de *P. aeruginosa* que son lisogenizadas por éste se convierten en productoras de la citotoxina. Las cepas productoras de la citotoxina son más virulentas que las isogénicas no productoras (Baltch *et al.*, 1994). Otro ejemplo de transferencia lateral es el caso de *Vibrio cholerae*, este patógeno depende de la producción de dos factores de virulencia importantes la toxina co-regulada por pilus (TCP) que es un factor de colonización y la toxina del cólera, que es una exotoxina. Los genes para estas toxinas están contenidos dentro del genoma de un fago filamentoso llamado CTX ϕ , el cual infecta a esta bacteria (Waldor y Mekalanos, 1996). Y para el caso de *Salmonella* se ha propuesto que la transferencia genética lateral ha sido una de las mayores directrices en la evolución de este género bacteriano y su virulencia (Zhang *et al.*, 2002).

Los modelos más reconocidos de fagos que codifican para factores de virulencia son aquellos que dirigen la síntesis de exotoxinas; estas incluyen

toxinas eritrogénicas de *Streptococcus pyogenes* (Weeks y Ferretti, 1986; Johnson *et al.*, 1986), la estafilokinasa y enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (Coleman *et al.*, 1989), la toxina Shiga-like y enterohemolisina (Ehly2) producidas por *E. coli* (Newland *et al.*, 1985; Beutin *et al.*, 1993), la neurotoxina de *Clostridium botulinum* (Barksdale y Arden, 1974). En muchos de estos casos, los genes para estas toxinas están localizados cerca del sitio de integración del bacteriófago, sugiriendo que estos genes fueron adquiridos por transducción (Coleman *et al.*, 1989; Laird y Groman, 1976; Jonson *et al.*, 1986; Betley y Mekalanos, 1988; Hayashi *et al.*, 1990). Otros genes de virulencia llevados por los bacteriófagos incluyen genes para la producción de cápsula por *S. pneumoniae* (Russel, 1991) y los probables genes de virulencia *glo*, los cuales son similares a la proteína G de los eucariontes que son llevados por el fago temperado K139 de *V. cholerae* (Reidl y Mekalanos, 1995). Se ha propuesto que la localización de estos genes para toxinas en los genomas de los bacteriófagos puede ser una estrategia que permite la rápida distribución para genes que codifican distintas variantes antigénicas de toxinas, siendo estas el principal blanco de la respuesta inmune del hospedero (Betley *et al.*, 1986).

Se ha demostrado que algunos profagos están involucrados en la adhesión bacteriana, entre estos destacan: el fago λ , el cual codifica para la proteína Lom (codificada por el gen *lom*) que promueve la adhesión a células bucoepiteliales humanas (Vaca *et al.*, 1997); el fago SM1 que codifica para dos

proteínas de membrana PblA y PblB que promueven la adhesión de *Streptococcus mitis* a plaquetas (Besing *et al.*, 2001) y el fago FIZ15 que también promueve la adhesión de *P. aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas (Vaca *et al.*, 1999).

3. Bacteriófagos que causan conversión lisogénica en *Pseudomonas aeruginosa*.

Las secuencias de los genomas de muchas bacterias y de los bacteriófagos que las infectan han estado siendo completadas rápidamente y en proporciones incrementadas; lo cual brinda una noción acerca de la evolución de los fagos y de su hospedero. Anteriormente se había mencionado que muchas de las cepas de *P. aeruginosa* son lisógenas por lo que resulta interesante mencionar a la mayoría de los fagos que tienen la capacidad de infectar varios aislados clínicos de *P. aeruginosa* (Tabla 2) y cómo pueden llegar a ser la principal razón de su estudio. Los fagos más conocidos hasta ahora que infectan a esta cepa son el fago F116L, fago filamentoso de transducción generalizada; el fago D3 relacionado con los fagos lambdoides; ?CTX (descrito anteriormente) y el recientemente publicado ?KMV el cual tiene una relación muy estrecha con los fagos T7-like (Lavigne *et al.*, 2003). Estos fagos al estar emparentados con otros fagos que infectan sólo cepas de *E. coli* y que ahora abrieron sus vías de infección hacia otro tipo de bacteria

como *P. aeruginosa*, indican de modo indirecto el ancestro del que provienen y la gran evolución en sus vías de infección y sus células hospederas.

Tabla 2. Diferentes bacteriófagos que infectan a *Pseudomonas aeruginosa*, se muestran su tamaño en pares de bases y el número de acceso a Genbank.

FAGO	TAMAÑO pb	Nº ACCESO	REFERENCIA
D3	56 426	NC 002484	Kropinski, 2000
? PaP3	45 503	NC 004466	Datos no publicados
? PaP2	43 783	NC 005884	Datos no publicados
? KMV	42 519	NC 005045	Lavigne <i>et al.</i> , 2003
? D3112	37 611	NC 005178	Datos no publicados
? CTX	35 580	NC 003278	Nakayama <i>et al.</i> , 1999
? PF1	7 349	NC 001331	Hill <i>et al.</i> , 1991
? PF3	5 833	NC 001418	Luiten <i>et al.</i> , 1985
? PP7	3 588	NC 001628	Olsthoorn <i>et al.</i> , 1995

4. Bacteriófago D3

D3 es un bacteriófago temperado, tiene cápside poliédrica de 55 nm de diámetro, cola flexible de 7 por 113 nm y de la que se proyectan 6 apéndices (Gilakjan y Kropinski, 1999). Pertenece a la familia *Siphoviridae*, la cápside envuelve al ADN lineal que mide 56 426 pb. Su genoma contiene 90 marcos de lectura abierta (ORF's) y 4 genes específicos para tRNAs. Los tRNAs pueden funcionar en la traducción de ciertas proteínas altamente expresadas (Kropinski, 2000).

El Bacteriófago D3 fue obtenido de un aislado clínico de *P. aeruginosa* por Holloway y Cooper (1962) quienes notaron que después de la lisogenización de la célula por D3 hay cambios en las propiedades serológicas de ésta. Kuzio y Kropinski (1983) mostraron que el LPS obtenido de la lisógena [PAO1 (D3)] carece de la actividad del receptor para este fago y que el antígeno-O del LPS tiene cambios debido a ciertas alteraciones químicas inducidas por el profago.

Farinha y Kropinski (1997) clonaron y analizaron la región involucrada en la inmunidad y en la morfogénesis de la cápside observando que presenta gran homología en estructura y función con la región de inmunidad de los fagos lambdoides, e igualmente describieron un ORF capaz de codificar una proteína tipo represor de 223 aminoácidos estructurada de modo similar a la de los fagos lambdoides.

5. Bacteriófago FIZ15.

El bacteriófago temperado FIZ15 fue aislado a partir de una cepa clínica de *P. aeruginosa*. Este fago causa conversión lisogénica en la cepa PAO1 (libre de fagos, estudiada genética y bioquímicamente). La lisógena (cepa denominada PIZ15) muestra adhesión aumentada a células bucoepiteliales humanas mediante un mecanismo, adicional al mediado por pili, el cual requiere que las bacterias estén metabólicamente activas, ya que el

incremento en la adhesión no ocurre cuando se agrega un desacoplante de la fosforilación oxidativa a la mezcla bacterias-células durante el ensayo de adhesión (Vaca *et al.*, 1989; 1999). FIZ15 también incrementa la resistencia al efecto bactericida del suero humano normal. (Vaca *et al.*, 1988; 1999). Además el profago FIZ15 aumenta la virulencia de PAOI en el modelo de ratón quemado. Lo cual muestra otro ejemplo de conversión lisogénica e incremento en la patogenicidad de *P. aeruginosa*.

Aparentemente los fenotipos de adhesión y resistencia al suero incrementados se deben a que el profago FIZ15 causa un alteración superficial a nivel del antígeno O, el cual es el propio receptor para el fago, ya que la lisógena PIZ15 no permite la adsorción de FIZ15 ni del fago D3 de *P. aeruginosa*, que se adsorbe específicamente al antígeno O y lo modifica por introducción de un grupo acetilo en la posición 4 de la fucosamina y por el cambio de un enlace entre las unidades repetidas de trisacáridos de α 1-4 a β 1-4 (Kuzio y Kropinski, 1983). De acuerdo a lo descrito para el fago D3 y su relación tan íntima con el fago λ , y del mismo modo su semejanza con FIZ15 en cuanto a la célula blanco de infección que es *P. aeruginosa* y su parecido morfológico, se cree que el bacteriófago FIZ15 proviene del mismo linaje de los fagos lambdoides.

6. BANCOS GENÓMICOS

Las técnicas experimentales de ingeniería genética, ADN recombinante y biotecnología constituyen actualmente la metodología más poderosa y eficaz para elucidar la estructura y función de genes y cromosomas y por ende para resolver un sinnúmero de problemas de carácter inmunológico, además de ofrecer soluciones potenciales a corto plazo. Un banco genómico se puede definir como un conjunto de clonas que contienen fragmentos de ADN insertados en un vehículo de clonación (plásmido o fago), representando todo el genoma de un organismo particular.

Dentro de las técnicas de recombinación de ácidos nucleicos *in vitro* es interesante mencionar que el establecimiento de librerías genómicas o bancos de clonas es la base para este trabajo en particular. La construcción de el banco genómico de un bacteriófago permite estudiar los mecanismos regulatorios del ciclo lisogénico y del ciclo lítico del fago, las secuencias involucradas con los factores de virulencia y la relación filogenética del bacteriófago con los fagos lambdoides. Por lo que el propósito de este trabajo fue construir un banco genómico de FIZ15 por restricción y clonación de los fragmentos.

6.1 Vector pUC19.

Uno de los plásmidos más empleados como vehículo de clonación es el vector híbrido fago-plásmido de la serie pUC (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), el vector pUC19 presenta varias ventajas: 1) Es un ADN circular, pequeño y cerrado covalentemente, lo cual lo hace de fácil aislamiento y manipulación *in vitro*; 2) Contiene el gen *amp^r* como marcador de selección, de este modo sólo las células que porten el plásmido crecerán en medio con ampicilina; 3) Es de alto número de copias, por lo que se obtienen grandes cantidades de ADN a partir de cultivos celulares pequeños; 4) La región de policlonación contiene varios sitios de corte para enzimas de restricción, esto significa que varios tipos de fragmentos de restricción pueden insertarse sin modificación alguna; 5) La región de policlonación interrumpe el extremo 5' del gen *lacZ* de *E.coli*, esto es de gran ayuda ya que de este modo las colonias que posean plásmido con ADN extraño insertado pueden distinguirse de las que no llevan ADN extraño en el plásmido por una prueba de color. 6) El gen *lacZ* está bajo el control del promotor *lac*, así los genes insertados en el marco de lectura adecuado pueden expresarse para producir productos de fusión β -galactosidasa-gen extraño; 7) Posee el origen de replicación del plásmido, así la duplicación del ADN del vector produce grandes cantidades de ADN plasmídico de doble cadena. y 8) porta el origen de replicación del fago M13 lo cual hace posible la producción de ADN de cadena sencilla.

El gen *LacZ* de *E. coli* codifica a la β -galactosidas, enzima que rompe la lactosa en glucosa y galactosa. Este es el primer paso del catabolismo de la lactosa en *E. coli*. La presencia de β -galactosidasa en las células puede determinarse con base en la capacidad de ésta para descomponer el sustrato 5-bromo, 4-cloro, 3-indol- β -D-galactósido (Xgal) en galactosa y 5-bromo, 4-cloroíndigo; el 5-bromo, 4-cloroíndigo es azul, de este modo las células que contienen β -galactosidasa activa producen colonias azules en un medio que contenga Xgal; mientras que las células que carezcan de actividad de β -galactosidasa producen colonias blancas en placas. El desarrollo de esta simple prueba de color facilita enormemente la identificación de recombinantes, y así es fácil analizar cientos de colonias visualmente y reconocer aquellas que lleven un posible plásmido recombinante para luego ser verificados mediante análisis restricción.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo General

- Construcción del banco genómico del fago FIZ15

2. Particulares

1. Obtener ADN de FIZ15 y ADN plásmidico de pUC19.
2. Restricción del ADN fágico y del plásmido pUC19.
3. Obtener ADN recombinante pUC19- FIZ15 con el que se transformará a *E. coli DH5a*.
4. Tener representado todo el genoma de FIZ15 en clonas de *E. coli Lac Z*

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Biológico.

- La cepa PAO1 de *P. aeruginosa* fue donada por B. W. Holloway, Monash University, Australia; y la cepa *E. coli* DH5 α .
- El Bacteriófago FIZ15 fue aislado en la FES- Iztacala por S. Vaca Pacheco a partir de un aislado clínico de *P. aeruginosa* obtenido de una herida humana infectada.
- Plásmido pUC19 utilizado como vector de clonación.

2. Medios de Cultivo y soluciones

Todos los medios utilizados se obtuvieron de Merck y Bioxón de México. Los cuales fueron: Caldo nutritivo (CN), Caldo Luria and Bertania (LB), Agar Nutritivo (AN) y Agar Suave (AS) que es CN más agar bacteriológico al 0.6%.

3. Micrografía electrónica del Bacteriófago FIZ15

Para obtener la micrografía electrónica se preparó un stock del fago FIZ15. Las partículas del fago fueron teñidas negativamente con ácido fosfotungstenico.

4. Obtención, Cuantificación y Restricción del ADN de FIZ15.

Para la extracción de ADN fágico se obtuvieron placas aisladas y una de ellas se resuspendió en 1 ml de SM (Solución Salina; ver apéndice para su composición) incubándose a 4°C toda la noche. Al siguiente día se infectaron 100µl de cultivo saturado de bacteria con 150µl de suspensión del fago y 3 ml de AS sobre una caja de Petri con AN, se incubó a 37°C por toda la noche o hasta lisis total. Posteriormente se añadió 5 ml de SM, se incubó a 4°C de 6-8 h. Al término la suspensión se tomó con pipeta y se enjuagó la caja de Petri con 1 ml de SM en posición inclinada para que resbalara el sobrenadante por 1 min., al lisado se le agregaron 100µl de cloroformo y se incubó en agitación por 15 min. a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 15,000 r.p.m por 10 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril para precipitarlo con 4 ml de Polietilenglicol al 20% (PEG 6000) por cada 30 ml de lisado, incubándose a 4°C toda la noche, al término se centrifugó a 15 000 r.p.m a 4°C por 20 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y se invirtió el tubo para eliminar lo más posible los restos de PEG ya que este puede inhibir las reacciones enzimáticas. La pastilla se resuspendió en 500µl de buffer TE pH 8.0 y se agregó 1 vol de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), agitándolos en vortex por 2 min. a nivel medio y centrifugando por 5 min. a temperatura ambiente. La fase acuosa (superior) se pasó a otro tubo eppendorf y se le adicionaron 2.5 vol de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M, pH 5.8. Se mezcló por inversión y se dejó precipitar por 1h a -20°C. Posteriormente se

centrifugó a 14 000 r.p.m durante 15 min. a 4°C. La pastilla se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% y finalmente se resuspendió en 100µl de agua inyectable estéril.

La cuantificación de ADN se llevó a cabo por medio de espectrofotometría, haciendo una dilución del ADN obtenido (2 µl de ADN en 1 ml de agua), cuya densidad óptica se midió a una longitud de onda de 260nm tomando como blanco 1 ml de agua. La concentración del ADN se obtuvo multiplicando la densidad óptica por la dilución.

Para la digestión del ADN fágico se probaron varias enzimas, algunas que generan extremos romos y otras cohesivos, con el propósito de elegir entre ellas la que diera un mejor patrón de restricción; es decir, que originara varios fragmentos para tener garantizado que se está abarcando en su totalidad el ADN del fago. Como resultado de estos ensayos se eligió a la enzima Hind III (datos no mostrados). Posteriormente se llevo a cabo una cinética de restricción en la cual sólo se varió el tiempo de acción de la enzima; la reacción enzimática se incubó a 37°C por un tiempo de 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 min. La actividad de la enzima se detuvo incubando la mezcla a 65°C durante 20 min.

1. Obtención, Purificación y Restricción del ADN plasmídico.

Para la construcción del banco se utilizó como vector el plásmido pUC19, su obtención y purificación se llevó a cabo conforme a la técnica descrita en el Manual de Laboratorio de Sambrook (1989).

La cepa portadora del plásmido se cultivó por estría cruzada en placas de LB incubándose de 12-16h a 37°C, para la obtención de colonias aisladas. Se inoculó la colonia en 3 ml de medio LB líquido en tubos de ensayo de 15 ml a 37°C con agitación de 200 r.p.m durante 12-16h. El cultivo líquido se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril y se centrifugó a 14 000 r.p.m por 5 min.; se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 100 µl de la solución 1 (Glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM) estéril previamente enfriada en hielo. Se agregaron 200µl de solución 2 (NaOH 0.2 N; SDS 1%) preparada justo antes de su uso; se agitó por inversión varias veces, se agregó posteriormente 150µl de la solución 3 (Acetato de Potasio 5M; Ácido acético glacial y agua destilada) también fría, se agitó por inversión hasta homogenizar y se colocó en hielo por 3-5 min. Se centrifugó a 14 000 r.p.m durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrífuga y se le agregó 1 vol de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1); la mezcla se agitó en vortex hasta que estuvo homogénea. Se centrifugó 5 min. a 14 000 r.p.m y la fase acuosa se transfirió a otro tubo y se le agregaron 2 vol. de etanol absoluto muy frío. Se agitó por inversión y se

centrifugó 10 min. a 14 000 r.p.m a 4°C., la pastilla obtenida se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. La pastilla se secó por 10 min. a temperatura ambiente para que se evaporaran los restos de etanol y finalmente se resuspendió en 50µl de agua inyectable estéril.

Para la restricción del plásmido se utilizó la enzima Hind III (1-3 U) en un tiempo de 2h a 37°C. Los fragmentos de restricción del ADN fágico así como del plásmido se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y 1.0% respectivamente.

2. Ligación de los Fragmentos de ADN fágico al plásmido pUC19.

Para ligar los fragmentos del ADN de FIZ15 al ADN del plásmido se utilizó la T4 DNA ligasa durante 30s a 10°C, 30s a 30°C por 12 - 16 h en un Termociclador Perkin-Elmer, y en una relación molar de 1:3 (ADN plamídico: ADN fágico) (Lund *et al.*, 1996).

7. Obtención de Transformantes.

7.1 Preparación de Células Competentes.

Se inocularon 5 ml de LB con una colonia aislada de *E. coli DH5a*, se incubó toda la noche a 37°C en un baño de agitación. Posteriormente se

inocularon 30 ml de LB en un matraz de 250 ml con 1 ml del cultivo previo y se incubó a 37°C y 200 r.p.m hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.6 leyéndose en una longitud de onda de 600nm. Una vez llegada a la densidad óptica se enfrió el cultivo en hielo durante 15 min, en seguida se transfirió el cultivo a 2 tubos corex estériles y se centrifugó a 7000 r.p.m durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 15 ml de CaCl₂ 0.1 M estéril y muy frío. Se incubó en hielo 2-4 h y a continuación se centrifugó el cultivo a 7000 r.p.m durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 ml de CaCl₂ 0.1 M estéril y frío agregándole 340µl de glicerol 100% estéril y frío. Se alicuotaron 120µl de la suspensión celular en tubos de microcentrifuga y se congelaron en nitrógeno líquido para después almacenarlos a -70°C.

7.2 Transformación de la ligación

Se descongelaron en hielo 120µl de células competentes y se les agregaron entre 100 y 500ng del ADN de la mezcla de la ligación. Se mantuvo en incubación a 4°C por 30 min y al término se dió un shock térmico llevando la mezcla a 42°C por 2 min. Enseguida se transfirieron las células a 1 ml de LB sin antibiótico, incubando a 37°C en baño de agitación a 200 r.p.m durante 1h. Posteriormente se espatularon 100µl de cultivo en el medio de crecimiento y con antibiótico adecuado y el resto del cultivo se concentró por centrifugación y se espatuló del mismo modo.

IV. RESULTADOS

1. Micrografía electrónica del Bacteriófago FIZ15

El Bacteriófago FIZ15 fue obtenido de un aislado clínico de *P. aeruginosa*, y el estudio de microscopía electrónica de este bacteriófago muestra que es un miembro de la familia *Siphoviridae*. Posee una cabeza (cápside) y un tallo contráctil flexible (Fig. 2); y la cápside envuelve al genoma que es ADN de doble cadena.

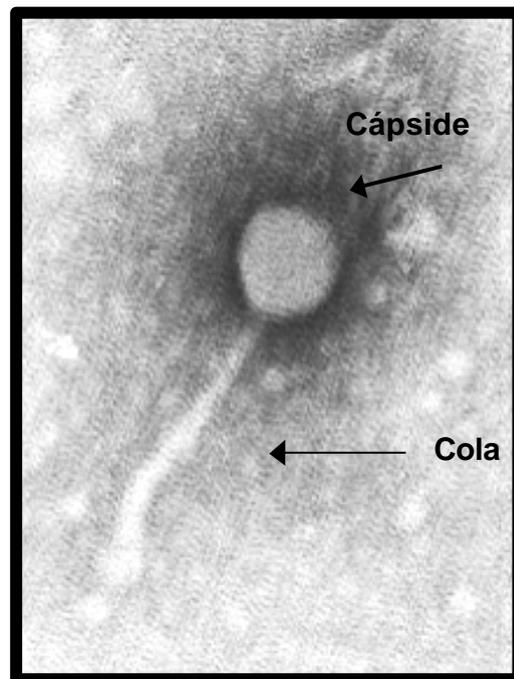


Fig. 2. Micrografía electrónica del Fago FIZ15, en la cual se muestra la morfología de este fago. Cabeza icosaédrica y tallo flexible.

2. Obtención de ADN fágico.

El ADN fágico obtenido a partir de lisados fágicos en placa confluyente de FIZ15 se observó en buenas condiciones lo cual pudo ser corroborado en el gel de agarosa (Fig. 3) al notar una banda de gran tamaño en la parte superior, con bastante intensidad, no degradado y sin contaminación de ARN, el cual se eliminó con RNasa (10 mg/ml) antes de someterlo a la digestión con la enzima de restricción. Por lo que se consideró al ADN en condiciones óptimas para proseguir con la secuencia experimental.



Figura 3. ADN fágico obtenido del Bacteriófago FIZ15. Carril 1: ADN de λ . Carril 2: ADN de FIZ15. Condiciones de la Electroforesis: Agarosa al 0.8%, 120 V, 94 mA durante 35 min.

2.1. Cuantificación de ADN fágico

La cuantificación se llevó a cabo por medio de espectrofotometría, la lectura obtenida para la muestra de ADN fágico fue de 0.069 y la dilución que se realizó de la muestra fue 1/50, por lo que se obtiene que:

$$\text{Concentración de ADN} = \text{densidad óptica} \times \text{dilución} \times 50\text{ng/ml.}$$

$$[\text{ADN}] = 0.069 \times 50 \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} = \mathbf{172.5 \text{ ng/ml.}}$$

2.2. Obtención de los fragmentos del ADN fágico.

Para la digestión del ADN de FIZ15 se probaron varias endonucleasas de restricción que fueron *Nco* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Xba* I, *Sma* I, y *Hind* III; esto con el objetivo de encontrar aquella enzima que diera un mapa de restricción más completo y que abarcara todo el ADN del fago; las cinco primeras enzimas utilizadas en la digestión daban pocos fragmentos (de 2 a 4) y en un rango de 1500 a 4000 pb, lo cual no representaba todo el genoma del fago. La enzima *Hind* III generó 7 bandas con diferentes tamaños moleculares que fueron: 650 pb, 2 000 pb, 5 000 pb, 7 000 pb, 10 000 pb, 12 000 pb y una de ~17 000 pb (Fig. 4). Para esto se hizo un ensayo de la digestión realizada a diferentes tiempos 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 min (Fig. 5) para definir el tiempo adecuado de corte. Pero como se observa en la figura 5 el tiempo no tuvo significancia alguna ya que los fragmentos obtenidos al minuto 30 son los mismos que al minuto 210.

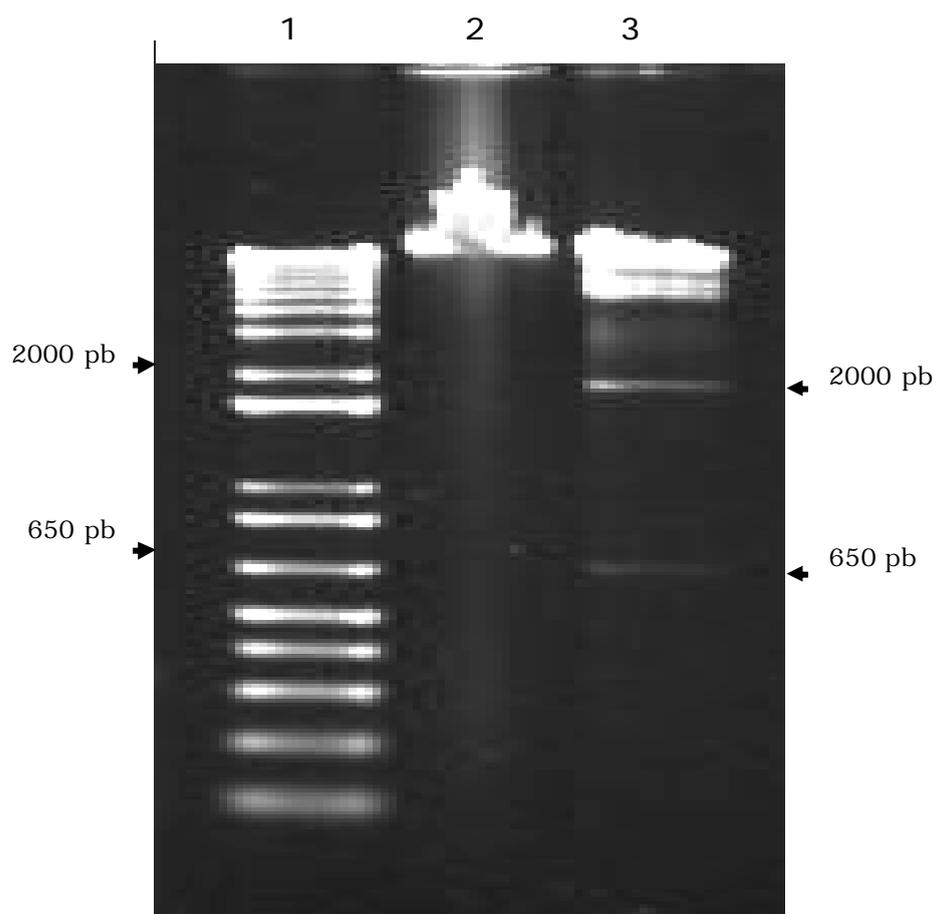


Figura 4. Restricción del ADN fágico con *Hind* III. Carril 1: 1Kb ladder, Carril 2: ADN de FIZ15 sin digerir, Carril 3: ADN de FIZ15 digerido. EL gel está al 1% sometido a electroforesis por 45 min, por lo que no se logro apreciar claramente las bandas de mayor tamaño y sólo los fragmentos de 2000 pb y 650 pb se distinguen.

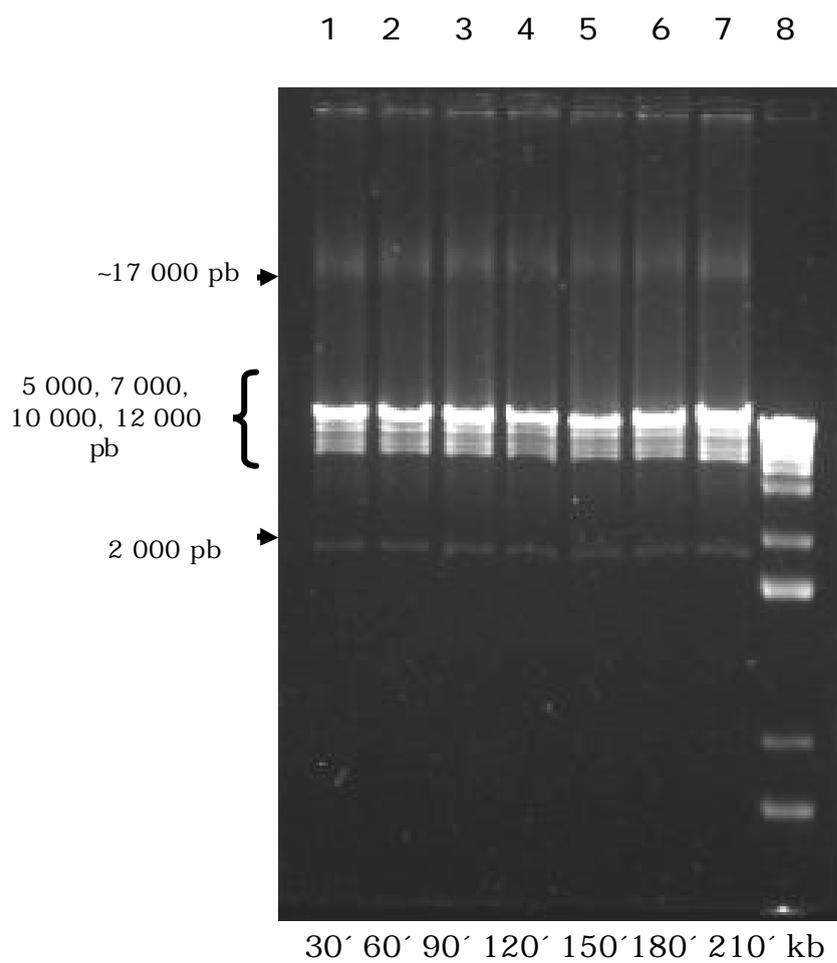


Figura 5. Digestión del ADN fágico con la enzima *Hind* III a diferentes tiempos (minutos). Del Carril 1 al 7: ADN fágico sometido a restricción durante diferentes tiempos, Carril 8: 1 Kb ladder como marcador. Gel al 0.8% sometido a electroforesis durante 90 min.

Por otra parte el fragmento de mayor tamaño obtenido (~17 000 pb) se digirió por segunda vez con la enzima *Sau* 3AI, la cual reconoce como sitio de corte cuatro nucleótidos GATC, y por esta razón se eligió ya que es mucho más probable que la enzima reconozca cuatro nucleótidos en lugar de seis, y así obtener fragmentos más pequeños y así facilitar la clonación en contraste con la del inserto inicial de gran tamaño. La digestión de este fragmento con *Sau* 3AI originó cuatro bandas, con un tamaño de 9 500 pb, 5 000 pb, 2 000 pb y 1 650 pb (Fig. 6).

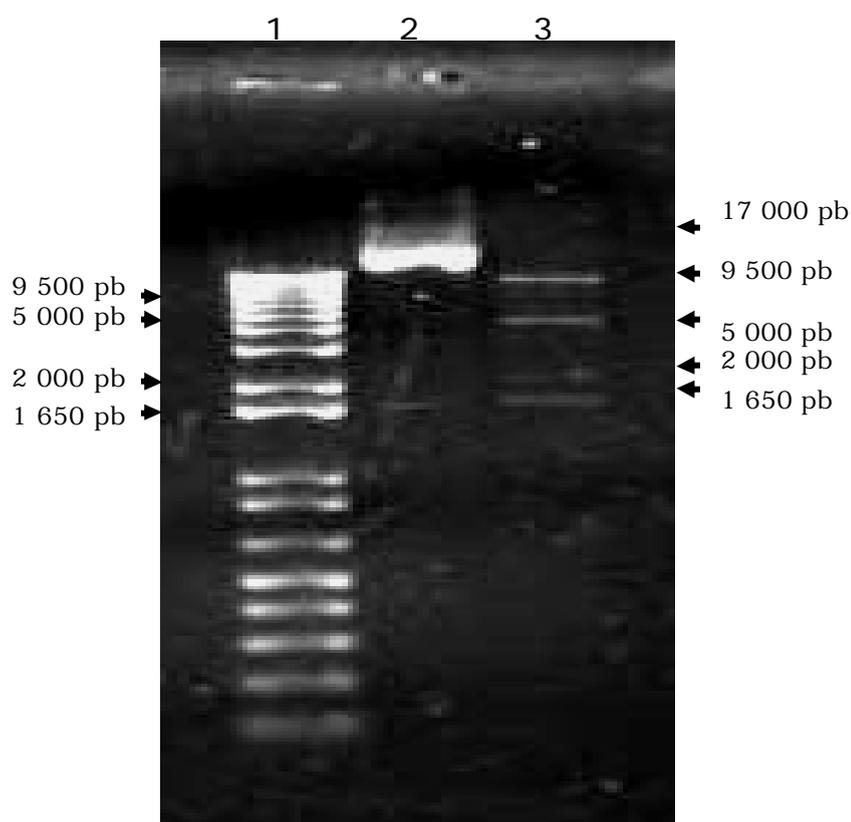


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% donde se visualiza la digestión del fragmento de ~17 000 pb con la enzima *Sau* 3AI. Carril 1: 1 Kb ladder, Carril 2: Fragmento de ~17 000 pb Carril 3: Digestión del fragmento anterior.

En la tabla 3 se muestra el total de los fragmentos obtenidos, su peso molecular y la concentración de cada uno de ellos para su posterior ligación al vector pUC19.

Tabla 3. Numero de fragmentos obtenidos de las digestiones del DNA de FIZ15. Los fragmentos del 1 al 6 son producto de la digestión con *Hind* III y los fragmentos del 7 al 10 fueron obtenidos de digestión del fragmento de ~17 000 pb con *Sau* 3A1.

FRAGMENTOS	TAMAÑO EN pb	CONCENTRACIÓN EN ng / μ l
1	650	54.5
2	2 000	63.2
3	5 000	35.40
4	7 000	29.0
5	10 000	23.80
6	12 000	19.7
7	9 500	22.6
8	5 000	36.3
9	2 000	25
10	1 650	42.5

3. Obtención del ADN plasmídico.

Para la elaboración del banco se utilizó el vector pUC19, el cual se obtuvo por lisis alcalina. En la Figura 7 se observan tres carriles (2, 3 y 4) donde se visualiza el ADN de pUC19 el cual tiene un tamaño molecular de alrededor de 3 900 pb ya que se encuentra en su forma superenrollada, además de presentarse sin contaminación por ADN cromosómico, ARN o degradado.

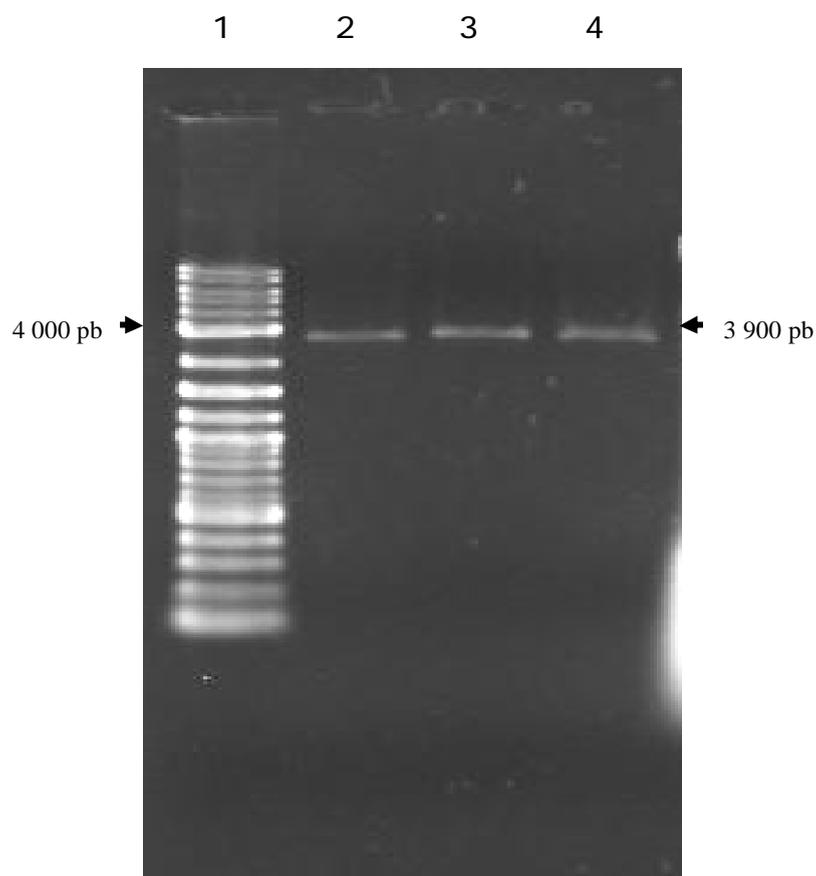


Figura 7. Electroforesis de pUC19. Carril 1: 1 kb ladder, Carriles 2, 3 y 4: pUC19 en su configuración superenrollada.

3.1 Obtención del Vector Restringido

El plásmido pUC19 fue sometido a restricción total con la enzima *Hind* III, ya que este plásmido tiene un sitio único de reconocimiento en el polilinker o MCS (sitio múltiple de clonación). Este sitio se encuentra en el gen *LacZ* que contiene este plásmido, como se observa en la figura 8. Una vez abierto el plásmido, vario su patrón de corrimiento en la electroforesis (Figura

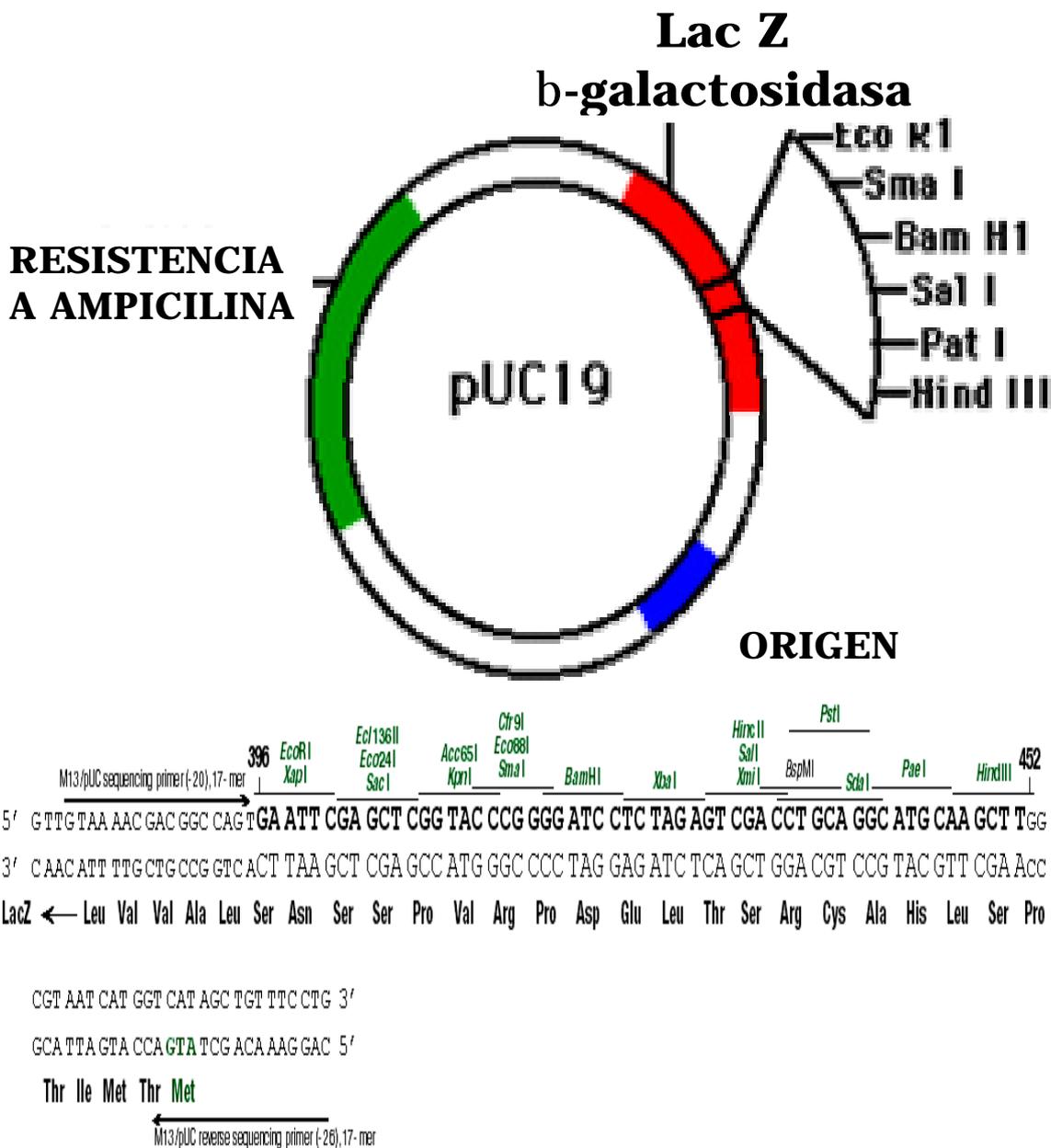


Figura 8. Mapa del plásmido pUC19, en color azul se encuentra el origen de replicación. En color verde el gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina y en color rojo el gen *lacZ* donde se encuentra el sitio de clonación múltiple (polilinker) con todas las secuencias de reconocimiento para las distintas endonucleasas de restricción.

9), encontrando una banda de 2 700 pb de tamaño, lo que revela que está en su forma linearizada, arreglo en el que se tiene que encontrar para utilizarlo en la ligación. Para el inserto que tuvo doble digestión; el plásmido fue linearizado con una doble digirió (usando *Hind* III y *Sau* 3A1), esta última enzima no tiene secuencia de reconocimiento dentro del polilinker del plásmido, por lo que se utilizo la enzima *Bam* HI (cuyo sitio de reconocimiento sí está dentro del polilinker) ya que posee extremos compatibles para *Sau* 3A1 y de este modo se ligarón los fragmentos obtenidos de la restricción.

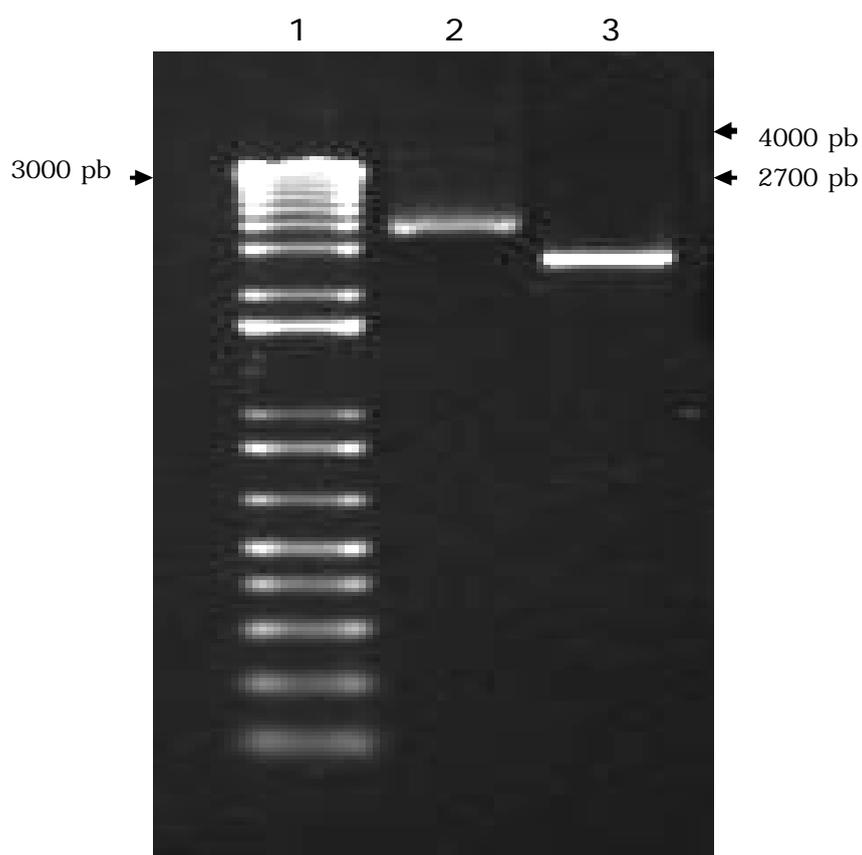


Figura 9. Electroforesis de pUC | 19. Carril 1: 1Kb ladder, Carril 2: pUC19 en su forma circularizada, Carril 3: pUC19 linearizado

3.2 Cuantificación del Vector.

La cuantificación se llevó a cabo por medio de espectrofotometría del mismo modo que la del ADN fágico. La lectura obtenida para la muestra de ADN plasmídico fue de 0.028 y la dilución que se realizó de la muestra fue 1/50, por lo que se obtiene que:

$$\textbf{Concentración de ADN} = \textit{densidad óptica} \times \textit{dilución} \times 50 \textit{ ng/ml}.$$

$$[\text{Vector}] = 0.028 \times 50 \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} = \textbf{70 ng/ml}.$$

4. Ligación.

Para la obtención de plásmidos recombinantes se cuantificaron las concentraciones de todos los fragmentos producto de las digestiones (Tabla 3, y la del plásmido linearizado para ligarlos en una relación molar vector: inserto de 1:3 (con la formula descrita en el apéndice). La mezcla de ambos ADNs fue ligada con la T4 DNA ligasa en un termociclador Perkin-Elmer con las condiciones de 30s a 10°C, 30s a 30°C durante 12 – 16 h. En la Figura 10 se esquematiza el mapa del plásmido recombinante y la posición en la que se encuentran los insertos.

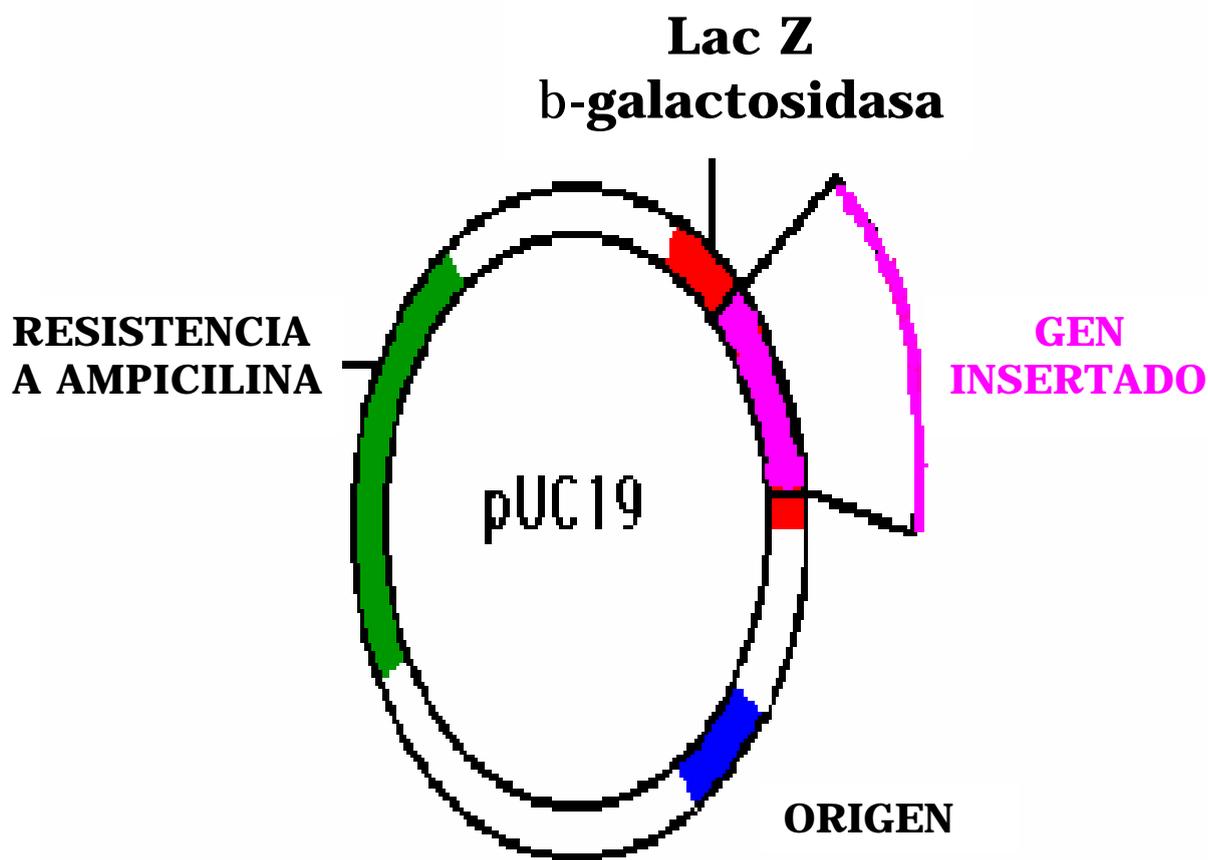


Figura 9. Mapa del plásmido pUC19 (recombinante), en donde se encuentran los insertos del Fago FIZ15 dentro del gen *LacZ*. Una vez ligados los insertos estos interrumpen el marco de lectura del gen de la β -galactosidasa.

5. Selección de colonias transformadas con plásmidos recombinantes.

La selección de las bacterias transformadas que llevaran plásmidos con fragmentos de ADN de FIZ15 se hizo desarrollando los candidatos en Agar Nutritivo con ampicilina, IPTG y Xgal, tomándose las colonias lactosa negativas (colonias blancas) como portadoras de plásmidos con inserto (Figura 11) mientras que las clonas lactosa positivas (colonias azules), sólo habían sido transformadas por plásmidos sin inserto, ya que el gen *lacZ* del plásmido no fue desfasado en su marco de lectura mientras que en las colonias blancas este gen si fue interrumpido.

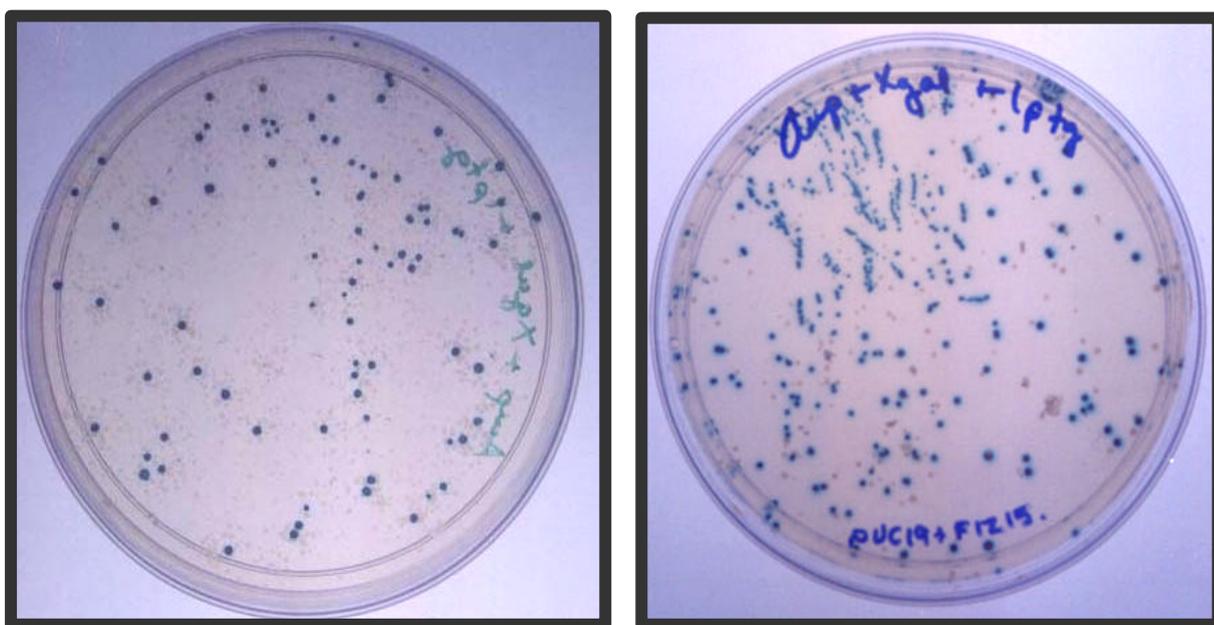


Figura 11. Fotografías que muestran la identificación y selección de las células que contienen plásmido pUC19 con inserciones de ADN de FIZ15. Las colonias azules contienen plásmido sin inserción y las colonias blancas tienen plásmido con inserción. Las cajas contienen AN complementado con ampicilina, Xgal e IPTG.

De esta selección se obtuvieron 900 clonas lactosa negativo (con inserto), a todas ellas se les extrajo ADN plasmídico con la técnica descrita en el manual de Sambrook, encontrando en la electroforesis (Figura 12) que los plásmidos que poseían inserto tenían mayor tamaño que los que no contenían.

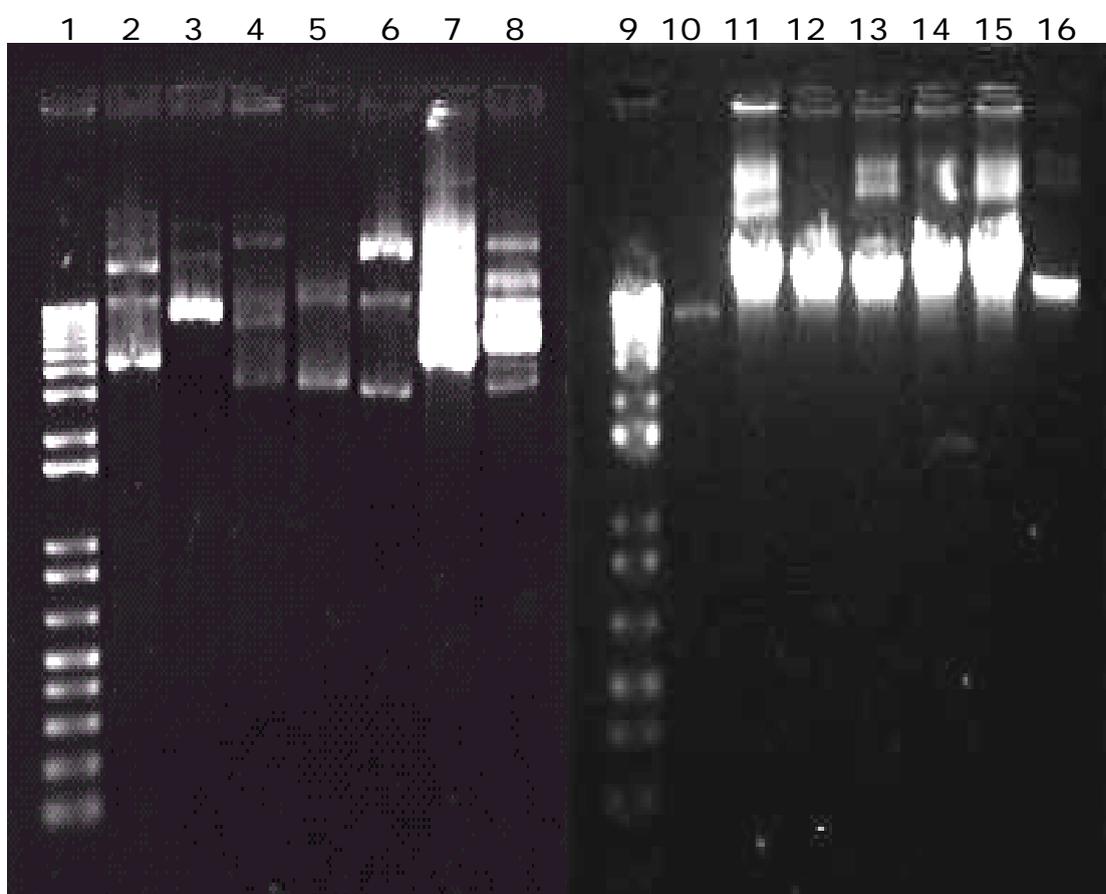


Figura 12. Electroforesis de los plásmidos obtenidos de diferentes colonias lactosa negativas (Carriles 2-8 y 10-16). Carriles 1 y 9: 1 Kb ladder.

6. Búsqueda de los fragmentos por análisis de restricción.

Para encontrar aquellas clonas que tuvieran los fragmentos, se seleccionaron los plásmidos cuyo patrón electroforetico indicara mayor peso. Posteriormente se analizaron por restricción las muestras, para lo cual se digirieron con *Hind* III con el propósito de comprobar que trajeran inserto, verificar su tamaño y tener todas las clonas con cada uno de los insertos liberados: 650 pb, 2000 pb y 5000 pb (Fig. 13) y 7000 pb, 10 000 pb y 12 000 pb (Fig.14).

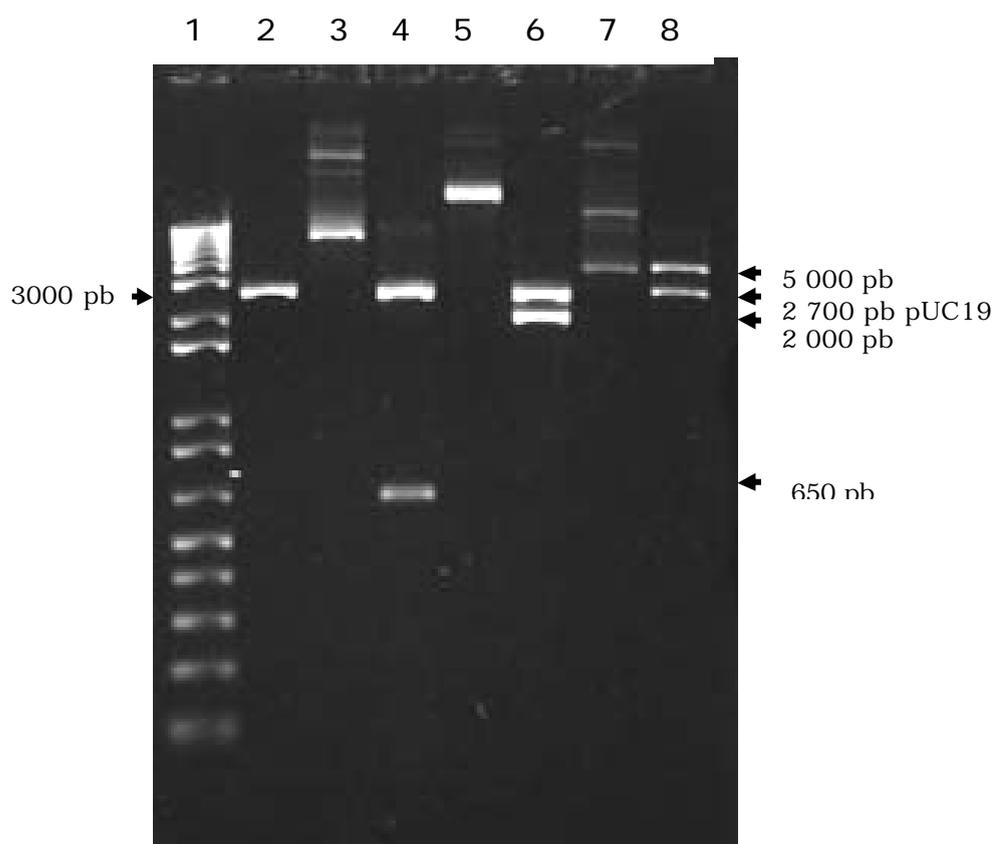


Figura 13. Liberación de los insertos por restricción con *Hind* III. Carril 1: 1 Kb ladder; Carril 2: pUC19 linearizado como marcador; Carriles 3, 5, 7: plásmidos sin digerir; Carriles 4, 6, 8: plásmidos digeridos.

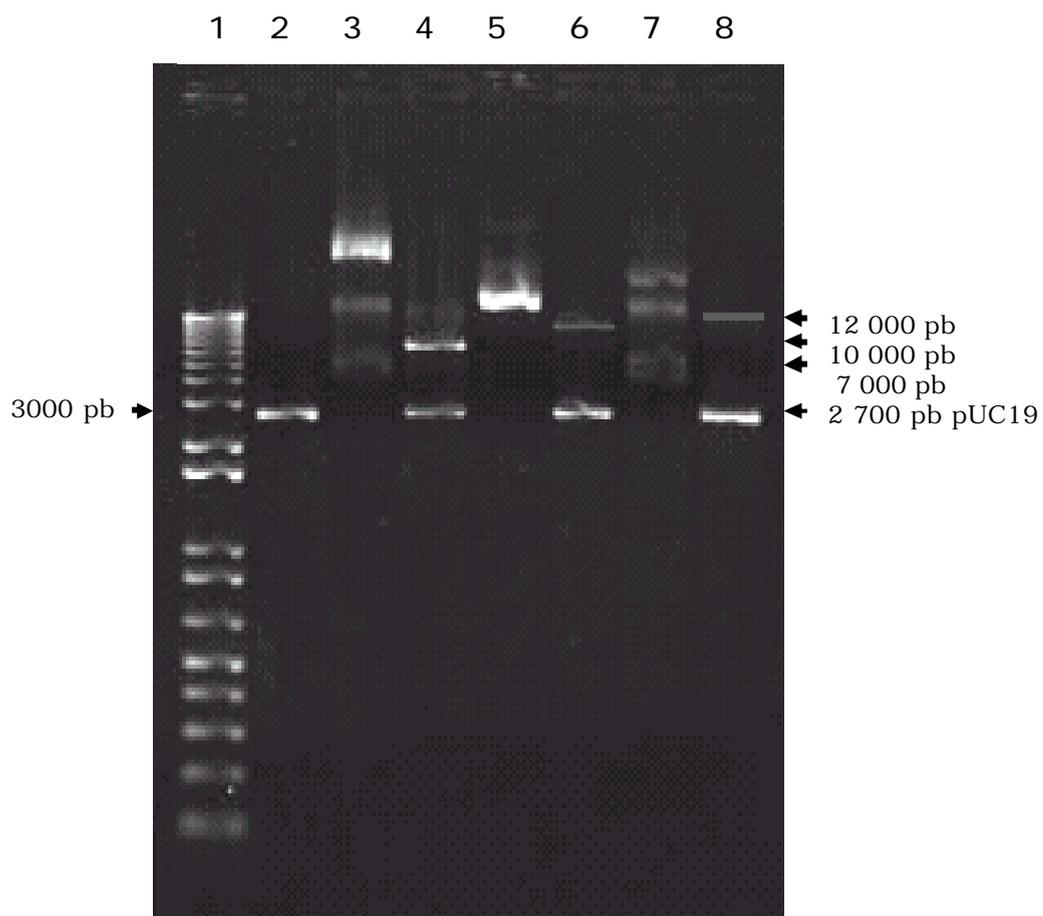


Figura 14. Liberación de los insertos por restricción con *Hind* III. Carril 1: 1 Kb ladder; Carril 2: pUC19 linearizado como marcador; Carriles 3, 5, 7: plásmidos sin digerir; Carriles 4, 6, 8: plásmidos digeridos.

Para liberar los insertos producto de la doble digestión se utilizó la enzima *Bam*HI, los fragmentos producto de este corte que fueron: 1 650 pb, 2000 pb y 5000 pb (Fig 15), y el último fragmento de 9 500 pb (Fig 16). Y así confirmar la presencia de estos dentro del plásmido pUC19.

Una vez encontrados todos los fragmentos de ADN de FIZ15 se sumaron para saber el contenido total del ADN en pares de bases, dando por resultado que el genoma de FIZ15 tiene 54, 800 pb.

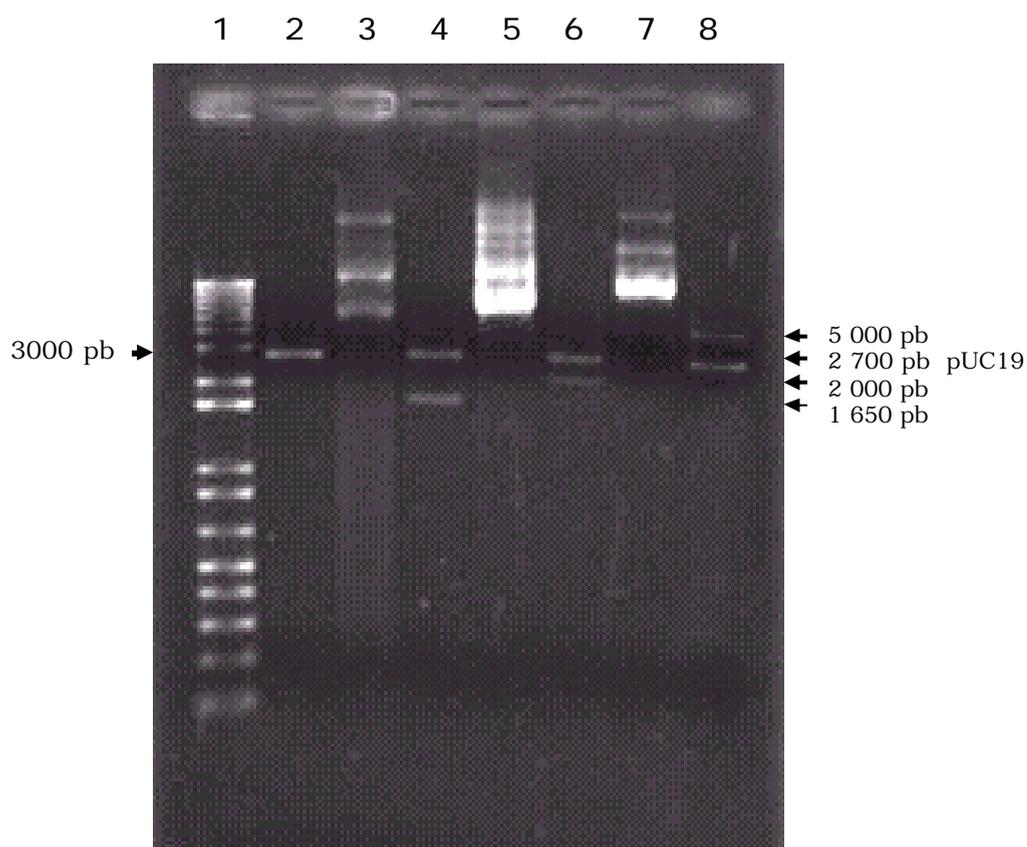


Figura 15. Liberación de los insertos por restricción con *Bam*HI. Carril 1: 1 Kb ladder; Carril 2: pUC19 linearizado como marcador; Carriles 3, 5, 7: plásmidos sin digerir; Carriles 4, 6, 8: plásmidos digeridos.

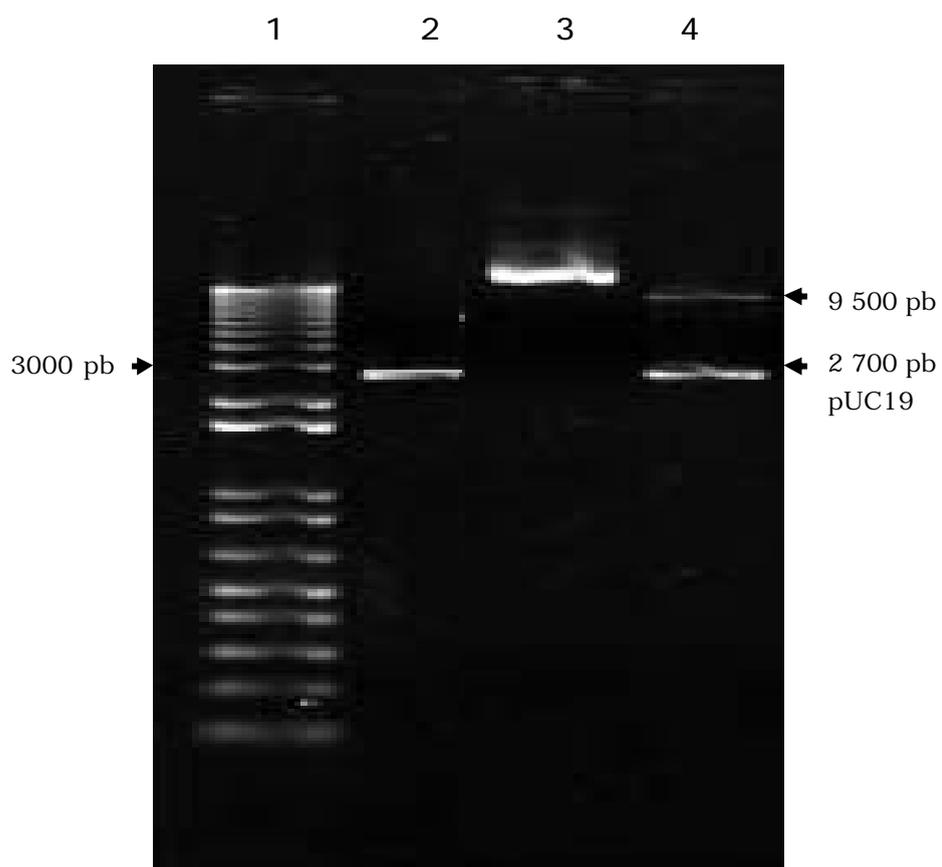


Figura 16. Liberación del último inserto por restricción con *Bam*HI. Carril 1: 1 Kb ladder; Carril 2: pUC19 linearizado como marcador; Carriles 3: plásmido sin digerir; Carriles 4: plásmido digerido.

V. DISCUSIÓN

El estudio del genoma de los bacteriófagos proporciona ideas básicas sobre diversos conceptos de biología fundamental, como estructura y organización genética, regulación temporal de la expresión de los genes, etc. Las investigaciones de los genomas virales se han enfocado principalmente a los fagos de *E. coli*, pero el estudio de los fagos de otros hospederos como *P. aeruginosa* es esencial para responder preguntas importantes con respecto al desarrollo de los bacteriófagos y los procesos evolutivos de éstos, al igual que de la bacteria hospedante.

Las características más importantes que se consideran para la clasificación de los fagos son su morfología y el ácido nucleico que poseen, aunque el rango de huésped que infectan también influye. El fago λ es uno de los mayores representantes de la familia *Siphoviridae*, a la que pertenece el fago FIZ15. Este fago tiene una cápside icosaédrica proteica que envuelve al ADN de doble cadena y una cola contráctil flexible. El tamaño de su ADN es de 54 800 pb, considerablemente grande, en comparación a los otros fagos que infectan a *P. aeruginosa* (tabla 2); de los cuales el más similar en tamaño y morfología es el fago D3, con 56 426 pb. La similitud entre FIZ15 y D3 no se reduce sólo al tamaño de su genoma; ambos profagos se adsorben al mismo receptor bacteriano (antígeno O del LPS) y causan conversión lisogénica al modificarlo (Vaca *et al.*, 1999). Uno de los fenotipos conferidos por FIZ15 y D3

a su lisógena es la resistencia al efecto bactericida del suero humano (Vaca *et al.*, 1999), propiedad que comparten con otro miembro de la familia *Siphoviridae*, el fago λ (Barondess y Beckwith, 1990). El responsable de la resistencia al suero conferida por λ es el gen *bor*, el cual codifica para una lipoproteína de membrana externa (Barondess y Beckwith, 1995), en tanto que D3 modifica las cadenas laterales del LPS por introducción de un acetilo en la posición 4 de las fucosaminas y por el cambio del enlace entre los trisacáridos repetidos de $\alpha 1 \rightarrow 4$ a $\beta 1 \rightarrow 4$ (Kuzio y Kropinski, 1983). No se conoce el gen o los genes responsables de la conversión lisogénica causada por FIZ15.

Con el propósito de iniciar la caracterización de los determinantes genéticos de FIZ15 implicados en la conversión lisogénica, decidimos construir un banco genómico de este bacteriófago.

Ahora bien, en las técnicas de ingeniería genética es importante que el ADN a clonar (en nuestro caso el ADN fágico y plasmídico) se encuentre en las mejores condiciones posibles, esto es, sin degradación, libre de ARN, limpio de proteínas y sobre todo carente de los restos de fenol, contaminantes que interfieren en la restricción y en la clonación. El ADN fágico se obtuvo en las mejores condiciones posibles, ya que se trató con RNAsa y tres veces con fenol:cloroformo para eliminar todos los restos de proteínas y de ARN. El ADN plasmídico se obtuvo libre de proteínas contaminantes.

La pureza de los ADNs se confirmó por su absorción de luz de varias longitudes de onda. Una primera lectura se hizo a 320 nm para detectar los posibles restos de fenol, cloroformo y alcohol que pudieran estar contaminando la muestra de ADN. La segunda lectura fue a 230nm que detecta restos de proteínas, y la tercera a 280nm para carbohidratos; y así descartar la posibilidad de estar considerando las impurezas y proteínas dentro de la lectura de 260 nm.

Una vez cuantificados los ADN's, se realizó la cinética de restricción de éstos en las condiciones ya mencionadas; con los productos resultantes se llevó a cabo la ligación para obtener el banco genómico, el cual se utilizó para transformar a *E. coli* DH5 α .

Para la transformación se utilizó la cepa receptora en la fase de crecimiento log, ya que es necesario tener a la cepa bacteriana entre el rango de 10^7 y 10^8 células/ml, ya que en esta fase de desarrollo su pared se está sintetizando activamente haciendo mucho mas viable la obtención de células competentes; una vez obtenida la densidad celular se trató a la bacteria con una solución de CaCl_2 muy fría ya que aparentemente este tratamiento induce a un estado transitorio de "competencia" por parte de la bacteria, durante el cual éstas tienen la capacidad de tomar del exterior ADN derivado de una gran variedad de fuentes.

En base a todas las ventajas que ofrece el vector se identificaron y se seleccionaron las colonias bacterianas que contenían plásmidos recombinantes por dos métodos; el primero fue por α -complementación y el segundo por análisis de restricción por preparación de ADN plasmídico a pequeña escala. El primer método empleado para la identificación y selección de las colonias recombinantes es el uso de la α -complementación, ya que muchos de los vectores usados actualmente (por ejemplo los de la serie pUC) llevan un pequeño segmento de la secuencia regulatoria de *E. coli* y la información para los primeros 146 aminoácidos del gen de la β -galactosidasa (*lacZ*); dentro de esta región se encuentra el sitio de policlonación que no interrumpe el marco de lectura de este gen por la inserción de secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción. Los vectores de este tipo son usados en células hospederas que codifiquen para la porción carboxilo terminal de la β -galactosidasa; aunque la parte codificante del hospedero ni los fragmentos codificados por el plásmido son activos, estos pueden asociarse para formar una proteína enzimáticamente activa; este tipo de complementación en el que la delección del segmento del operador del gen *lacZ* son complementados por la β -galactosidasa que tiene la región del operador intacta, es llamada α -complementación. Las bacteria Lac⁺ que resultan de la α -complementación son fácilmente reconocidas porque forman colonias azules en presencia de un substrato cromogénico (Xgal). Esta prueba de color a la que se hace referencia anteriormente está fundamentada en la distinción entre células que albergan plásmidos sin ADN extraño insertado de las que sí

poseen ADN extraño insertado. Básicamente esta prueba consiste en la inactivación funcional del segmento 5' del gen *lacZ* presente en el vector por medio de la inserción de ADN extraño en el sitio múltiple de clonación.

El segundo procedimiento empleado fue el de análisis de restricción, a pesar de ser un procedimiento laborioso debido a que hay que obtener ADN plasmídico de cada colonia transformada, tratarlo con enzimas de restricción y separar los fragmentos por electroforesis en geles de agarosa, es el método de elección cuando hay una alta oportunidad de encontrar las recombinantes dentro de un número pequeño de colonias transformadas y escogidas al azar, por ejemplo, cuando la ligación del segmento de ADN extraño al vector origina un número de colonias transformada significativamente más alto que el obtenido en la ligación control (vector solo).

De este modo se obtuvo el banco genómico de FIZ15 representado en 10 clonas que poseen un inserto de 650 pb, otro de 1 650 pb, dos de 2 000 pb, dos de 5 000 pb, uno de 7 000 pb, uno de 9 500 pb, uno de 10 000 pb y el último de 12 000 pb teniendo todo el genoma del fago FIZ15.

VI. CONCLUSIONES

- 1.** El ADN del bacteriófago FIZ15 se logró restringir totalmente con las enzimas *Hind* III y *Sau* 3A1 durante 60 minutos. El vector pUC19 se cortó con *Hind* III y *Bam* HI.
- 2.** Los fragmentos de ADN fágico de FIZ15 se insertaron en los sitios *Hind* III y *Bam* HI utilizando la T4 DNA ligasa.
- 3.** Los productos de la ligación fueron utilizados para transformar la cepa *E. coli* DH5 α (*r*⁻, *lacZ*⁻). Las cepas transformantes fueron seleccionadas por resistencia a ampicilina, α -complementación y análisis de restricción.
- 4.** Se encontraron todas las clonas que contenían los diez insertos que representan el genoma de FIZ15.
- 5.** El genoma de FIZ15 mide 54 800 pb.

VII. PERSPECTIVAS

El banco genómico realizado en este proyecto tiene grandes aplicaciones para poder elucidar la funcionalidad y estructura del bacteriófago FIZ15 y sumando a esto las existentes similitudes entre los bacteriófagos D3 y FIZ15, y la cercana relación con los fagos lambdoides; así como el hospedero común de los dos primeros, que es *P. aeruginosa*, sería interesante:

- Secuenciar todo el ADN de este fago para precisar el tamaño del material genético.
- Comparar el porcentaje de homología entre FIZ15 y D3 así como el contenido de G + C para elucidar alguna transferencia lateral de cualquier otra bacteria o fago.
- En base a la secuencia conocer los mecanismos regulatorios de sus ciclos de vida, que son el lisogénico y lítico.
- Debido a que FIZ15 causa conversión lisogénica, sería interesante caracterizar los genes que inducen esta alteración fenotípica y así poder indagar más a cerca de este fenómeno.
- Clonar y analizar las regiones involucradas en la inmunidad del fago FIZ15, ver su homología en cuanto a estructura y función con la región de inmunidad de los fagos lambdoides.
- Recientemente se descubrieron unas proteínas inhibidoras de la quimiotaxis (CHIPS) en *S. aureus*, las cuales inhiben y atenúan los

receptores de los neutrofilos y la actividad del complemento. Se ha demostrado que los genes que codifican para las CHIPS (*chp*) son transducidos por un bacteriófago. Por lo que sería de gran interés indagar si FIZ15 (que también proporciona resistencia al suero a *P. aeruginosa*) contiene los genes *chp*.

VIII. APÉNDICE

* Medios de Crecimiento LB

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Peptona de Caseína	1.0 %
Extracto de Levadura	0.5 %
CaCl ₂	1.0 %
Agar (sólo para medio solido)	1.5 %

	CONCENTRACIÓN
Ampicilina	100 µg/ml
Xgal	40 µg/ml
IPTG	20 mM

* Soluciones para extracción de ADN fágico.

Solución Salina SM

REACTIVO	CONCENTRACION
NaCl	0.58 g
MgSO ₄	0.2 g
Tris- HCl	1M pH 7.5 (5 ml)
Aforar a 100 ml y esterilizar	

Buffer TE

REACTIVO	CONCENTRACION
Tris HCl	10 mM (pH 8.0)
EDTA	1 mM (pH 8.0)

* **Soluciones para extracción de plásmido.**

SOLUCION 1	CONCENTRACION
Glucosa	50 mM
Tris- HCl	25mM pH 8.0
EDTA	10mM pH 8.0

SOLUCION 2	CONCENTRACION
NaOH	0.2 N
SDS	1%

SOLUCION 3	CONCENTRACION
Acetato de Potasio	60ml, 5 M
Ácido Acético	11.5 ml
H ₂ O	28.5 ml

Cuadro 1. Se preparan por separado y se esterilizan por 15 min a 1 libra/pulg². La solución 2 se utiliza recién preparada.

* Geles de agarosa

Para observar el ADN se preparó agarosa al 0.8 % y 1% fundiéndola con solución amortiguadora de TBE al 0.5X. Los geles fueron corridos en una cámara de electroforesis horizontal a 120V, 94mA por 30-40 min. con buffer TBE al 0.5X.

PREPARACIÓN DE TBE 5X (STOCK)	
Tris-base	54 g
Acido Bórico	27.5 g
EDTA	500mM pH 8 (20 ml)
Se afora a 1000 ml	

* Características de la cepa *E. coli* DH5 α .

Cepa *E. coli* DH5 α

Genotipo

Sup E44 Δ *lac* U169 (ϕ 80 *lac* Z Δ M15) *hsd* R17 *rec* A1 *end* A1 *gyr* A96 *thi* -1 *rel* A1 (Sambrook, 1989).

Características

Cepa deficiente en recombinación usada para propagar en ella plásmidos y cósmidos. El ϕ 80 *lac* Z Δ M15 permite la α -complementación con el extremo amino terminal de la β -galactosidasa codificada en los vectores de la serie pUC (Sambrook, 1989).

★ **Ecuación de relación molar para ligaciones.**

$$Xn \text{ Ins} = \frac{(Ypb \text{ Ins})(\text{Concentración Vector})}{\text{Tamaño en pb del Vector}}$$

Donde: Ypb Ins es igual al tamaño en pares de bases del inserto

Xn Ins es la concentración final que se debe utilizar para la ligación.

★ **Ligación de los fragmentos con T4 DNA ligasa.**

1. En un tubo eppendorf se depositó el producto de las digestiones previamente purificado, esto se hizo con un lavado de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar los restos de la enzima.
2. Se prepara una mezcla que contenga 1µl de buffer de ligación 10X (el buffer debe de quedar a 1X como concentración final), 50ng del vector pUC19, 100ng de los productos de los cortes, 0.5U de T4 DNA ligasa y se afora a 10 µl.
3. Se mezcla todo lo anterior con pipeteo suave y se liga durante 30s a 10°C, 30s a 30°C por 12 - 16 h.

4. Posteriormente se conserva la ligación a -20°C y se utiliza inmediatamente para transformar.

NOTA: el volumen final de la reacción no debe sobrepasar 15 μl .

★ **Eliminación de RNA.**

1. A la muestra de ADN de le agrega 10mg/ml de RNAsa; se incuba de 20-25 min a 37°C .
2. Se lava una vez con un volumen de fenol: alcohol isoamilico (24:1) y un segundo lavado con cloroformo. La fase superior (acuosa) se pasa a otro tubo limpio.
3. Se precipita con etanol al 100% por 20 min y se centrifuga a 14 000 rpm / 5 min.
4. Posteriormente se lava con un volumen de etanol al 70% y finalmente se resuspende con 100 μl de agua desionizada estéril.
5. Visualizar en gel de agarosa al 1%.

★ **Selección de transformantes de *E. coli* DH5a por a-complementación y resistencia a antibiótico.**

1. De las colonias obtenidas en la transformación se eligen todas las colonias blancas para picar.
2. Se pica en la colonia elegida y se resiembra por picadura en una caja con LB+ Amp+ IPTG+ Xgal.
3. Se inoculan las cajas toda la noche a 37°C .

4. Todas las colonias que crecieron en esta caja con ampicilina y que dieron nuevamente color blanco se toman como positivas a la α -complementación y resistencia al antibiótico, y serán las colonias a las que se les aplicará el análisis de restricción.

★ **Análisis de restricción de las colonias lactosa negativa.**

1. Se inocular cada colonia en 5 ml de medio líquido LB + amp y se incubará toda la noche a 37°C.
2. Se obtiene plásmido por la técnica descrita en material y métodos.
3. Adicionar el ADN del plásmido en un tubo eppendorf (30- 50 ng).
4. Agregar un 1/10 del volumen total del buffer al 10X de la enzima de restricción.
5. Agregar agua desionizada estéril al 80% del volumen total
6. Adicionar la enzima de restricción (1-3 U) y agitar suavemente con la pipeta.
7. Incubar a 37°C durante 3 h.
8. Preparar gel de agarosa al 1%, cargar las muestras del ADN digerido en los pozos del gel y correrlo a 120 V, 94 mA durante 35 min.
9. Verificar que el plásmido libere inserto.

IX. BIBLIOGRAFIA

- ◆ Baltch, A. L., Smith, R. P., Franke, M., Ritz, W., Michelsen, P., Bopp, L., and Lutz, F. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin as a pathogenicity factor in a systemic infection of leukopenic mice. *Toxicon*. 32: 27-34.
- ◆ Barksdale, L., and Arden, S. B. 1974. Persisting bacteriophage infection, lysogeny and phage conversion. *Annu Rev Microbiol*. 28: 265-299.
- ◆ Barondess, J.J and Beckwith, J. 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage. *Letters to Nature*. 346: 871-874.
- ◆ Barondess, J.J. and Beckwith, J. 1995. *bor* gene of phage λ , involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J Bacteriol*. 177: 1247-1253.
- ◆ Bensing, B. A., Rubens, C. E, and Sullam, P. M. 2001. Proteins PblA and PblB of *Streptococcus mitis*, which promote binding to human platelets, are encoded within a lysogenic bacteriophage. *Infect Immun*. 69:6186-6192.
- ◆ Bergen, G. A., and Shelhamer, J. H. 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to and old problem. *Infect Dis Clin*. 10: 297-325.
- ◆ Berka, R. M., and Vasil, M. L. 1982. Phospholipase C (heat labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*.; purification and preliminary characterization. *J Bacteriol*. 152: 239-245.

- ◆ Betley, M. J., Miller, V. L., and Mekalanos, J. J. 1986. Genetic of bacterial enterotoxins. *Ann Rev Microbiol.* 40: 577-605.
- ◆ Betley, M. J., and Mekalanos, J. J. 1988. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 170: 34-41.
- ◆ Beutin, L., Stroher, U. H., and Manning, P. A. 1993. Isolation of enterohemolysin (Ehly2) associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*. *Gene.* 132: 95-99.
- ◆ Brooks, G., Butel, J., and Morse, S. 2002. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.* 17 ed. Manual Moderno, México.
- ◆ Cryz, S. J., Pitt, T. L., and Germanier, R. 1984. Role of virulence of lipopolisaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infec Immun.* 44: 508-513.
- ◆ Casjens, S., Palmer, N., Van-Vugt, R., Mun-Huang, W., Stevenson, B., Rosa, P. 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 35: 490-516.
- ◆ Cheetham, B. F., and Katz, M. E. 1995. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol Microbiol.* 18: 201-208.
- ◆ Coleman, D., Sullivan, D. J., Russell, R. J., Arbuthnott, J. P., Carey, B. F., and Pomeroy, H. M. 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin,

staphylokinasa and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol.* 135: 1679-1697.

- ◆ Doring, G., Maier, M., Müller, E., Zoubair, B., and Krarazmi, A. 1987. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemoter.* 39: 136-148.
- ◆ Espejo, R. T. 1980. *Bacteriófagos*. 2 ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.
- ◆ Farinha, M., and Kropinski, A. 1997. Overexpression, purification and analysis of the *c1* repressor protein of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3. *Can J Microbiol.* 43: 220-227.
- ◆ Gilakjan, Z. A., and Kropinski, A. M. 1999. Cloning and analysis of the capsid morphogenesis genes of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3: another example of protein chainmail? *J Bacteriol.* 181:7221-7227.
- ◆ Govan, J .R., and Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic Fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60: 539-574.
- ◆ Hardalo, C., and Edberg, S. C. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol.* 23: 47-75.
- ◆ Hayasi, T., Baba, T., Matsumoto, H., and Terawaki, Y. 1990. Phage-conversion of cytotoxin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 4: 1703-1709.

- ◆ Hill, D. F., Short, N. J., Perham, R. N., and Petersen, G. B. 1991. DNA sequence of the filamentous bacteriophage PF1. *J Mol Biol.* 218: 349-364.
- ◆ Holloway, B. W., and Cooper, G. N. 1962. Lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 84: 1321-1324.
- ◆ Holloway, B. W. and Krishnapillai, V. 1975. Bacteriophages and bacteriocins, p. 99-132. In: Clarke, P. H. and M. H. Richmond (eds). *Genetics and Biochemistry of Pseudomonas*. Willey, London.
- ◆ Iglewsky, B. H., Sadoff, J. C., Bjorn, M. D., and Maxwell, E. S. 1978. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 75: 3211-3215.
- ◆ Jonhson, L. P., Tomai, M. A., and Schlievert, P. M. 1986. Bacteriophage involvement in group A streptococcal pyrogenic exotoxin A production. *J Bacteriol.* 166: 623-627.
- ◆ Kawahajaro, K., Homma J. Y., Aoyama, Y., Okada, K., and Morihara, K. 1975. Effects of proteasa from *Pseudomonas aeruginosa* on skin. *Jpn J Exp Med.* 45: 78-88.
- ◆ Kropinski, M. A. 2000. Sequence of the genome of the temperate, Serotype-Converting, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3. *J Bacteriol.* 182: 6066-6074.
- ◆ Kuzio, J., and Kropinski, A. 1983. O-antigen conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by bacteriophage D3. *J Bacteriol.* 155: 203-212.

- ◆ Laird, W. and Groman, N. 1976. Orientation of the tox gene in the prophage of corynebacteriophage beta. *J Virol.* 19: 228-231.
- ◆ Lavigne, R., Burkal'tseva, M. V., Robben, J., Sykilinda, N. N., Kurochkina, L. P., Grymonprez, B., Jonckx, B. Krylov, V. N., Mesyanzhinov, V. V., and Volckaert, G. 2003. The genome of bacteriophage ϕ KMV, a T7-like virus infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Virology.* 312: 49-59.
- ◆ Luiters, R. G., Putterman, D. G., Shoenmakers, J. G., Konings, R. N., and Day, L. A. 1985. Nucleotide sequence of the genome of PF3 and IncP-I plasmid-specific filamentous bacteriophage of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Virol.* 56: 268-276.
- ◆ Lund, A. H., Duch, M., and Pedersen, F. S. 1996. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res.* 24: 800-801.
- ◆ Miao, E. A., and Miller, S. I. 1999. Bacteriophages in the evolution of pathogen- host interaction. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 9452-9454.
- ◆ Min-Jou, W., Haegeman, G., Ysebaert, M., and Fiers, W. 1972. Nucleotide sequence of gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature.* 237: 82-88.
- ◆ Murray, P., and Kobayashi, G. 1997. *Microbiología Clínica*, 2° ed. Harcourt Brace, España.
- ◆ Nakayama, K., Kanaya, S., Ohnishi, M., Terawaki Y., and Hayashi. T. 1999. The complete nucleotide sequence of FCTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage

- evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Mol Microbiol.* 31: 399-419.
- ◆ Newland, J. W., Strockbine, N. A. Miller, S. F., O'Brien, A.D., and Holmes, R. K. 1985. Cloning of Shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of *Escherichia coli*. *Science.* 230: 258-264.
 - ◆ Nikaido, H., Okusu, H., Ma, D., and Li, X.-Z. 1996. Multidrug efflux pumps make a major contribution to drug resistance in *Pseudomonads*. In: *Molecular biology of Pseudomonads*. ASM Washington DC.
 - ◆ Olsthoorn, R. C., Garde. G., Dayhuff, T., Atkins, J. F., and VanDuin, J. 1995. Nucleotide sequence of a single-stranded RNA phage from *Pseudomonas aeruginosa*: Kinship to coliphage and conservation of regulatory RNA structures. *Virology.* 206: 611-625.
 - ◆ Pavloskis, O. R., Iglewshy, B. H., and Pollack, M. 1978. Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in experimental mouse infections: adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infect Immun.* 19:29-33.
 - ◆ Pollack, M. 1984. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infec Dis.* 6:5617-5626.
 - ◆ Reidl, J., and Mekalanos, J. J. 1995. Characterization of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139 and use of a novel mini transposon to identify a phage-encoded virulence factor. *Mol Microbiol.* 183: 685-701.
 - ◆ Russel, M. 1991. Filamentous phage assembly. *Mol Microbiol.* 5: 1607-1613.

- ◆ Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, N. York, U.S.A.
- ◆ Schultz, D. R., and Miller, K. D. 1974. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: Inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect Immun.* 10: 128:135.
- ◆ Sttover, C. K., Pham X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S., and Olson, M. V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.
- ◆ Summers, A. O., and Jacoby. G. A 1978. Plasmid determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 13: 627-640.
- ◆ Vaca, P. S., Martínez, G., Cruz, A., and Escobar, J. 1988. Decreased sensitivity to phagocytosis and serum bactericidal effect induced by FIZ15 bacteriophage in *Pseudomonas aeruginosa*.. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 30: 277-281
- ◆ Vaca, P. S., Arce, J., Oliver, G., Arenas, D., and Arguello, F. 1989. FIZ15 bacteriophage increases the adhesion of *Pseudomonas*

aeruginosa. to human buccal epithelial cell. Rev. Lat. Am. Microbiol. 31: 1-5.

- ◆ Vaca, P. S., García, O., and Paniagua, G.L. 1997. The *lom* gene of bacteriophage λ is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal epithelial cells. FEMS Microbiol. 156: 129-132.
- ◆ Vaca P.S, Paniagua, G.L., García, O., and De la Garza, M. 1999. The clinically isolated FIZ15 bacteriophage causes lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Curr. Microbiol. 38:299-243.
- ◆ Wagner, P. L., and Waldor, M. K. 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. Infect Immun. 70: 3985-3993.
- ◆ Waldor, M. K., and Mekalanos, J. J. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 272: 1910-1914
- ◆ Weeks, C. R., and Ferretti, N. N. 1986. Nucleotide sequence of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage T12. Infect Immun. 52: 144-150.
- ◆ Wick, M. J., Frank, D. W., Storey, D. G., and Iglewsky, B. H. 1990. Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginos* exotoxin A. Annu Res Microbiol. 44: 225-363
- ◆ Wieland, C. W., Siegmund, B., Senaldi, G., Vasil, M. L., Dinarello, C. A., and Fantuzzi, G. 2002. Pulmonary Inflammation Induced by *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide, Phospholipase C, and Exotin A: role of interferon regulatory factor 1. Infect Immun. 70: 1352-1358.

- ◆ Woods, D. E., Sttraus, D. C., Johanson, Jr., Berry, V. K., and Bass, J. A. 1980. Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian epithelial cells. *Infec Immun.* 29: 1146-1151.
- ◆ Yanisch-Perron, C., Viera, J., and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33: 103-119.
- ◆ Young, L.S. 1980. The role of exotoxins in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis.* 142: 626-630
- ◆ Zhang, S., Santos, R.L., Tsolis, R.M., Miroid, S., Hardt, W-D., Adams, L.G., and Baumler, A.J. 2002. Phage mediated horizontal transfer of the *sopE1* gene increases enteropathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for calves. *FEMS Microbiol.* 217: 243-247.
- ◆ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>